

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”**

***SCUOLA DI DOTTORATO “SCIENZE DELLA TERRA”  
“Giuseppe De Lorenzo”***

***Dottorato in Scienze ed Ingegneria del Mare***

***in consorzio con  
SECONDA UNIVERSITÀ DI NAPOLI  
UNIVERSITÀ “PARthenope” NAPOLI  
in convenzione con  
ISTITUTO PER L’AMBIENTE MARINO COSTIERO – C.N.R.  
STAZIONE ZOOLOGICA “ANTON DOHRN”***

***XXI ciclo***

Tesi di Dottorato

**FGAll: Applicazione agli ambienti marini profondi ed  
estremi**

Candidato: Dott.ssa Gina La Spada

Tutor: Dott. Vincenzo Saggiomo

Co-Tutor: Dott. Michail Yakimov

Il Coordinatore del Dottorato: Prof. Bruno D’Argenio

**ANNO 2008**

## ***Indice***

<b>PREMESSA</b>	<b>Pag. 4</b>
<b>INTRODUZIONE</b>	<b>Pag. 7</b>
<i>1 - Ambienti marini e cicli biogeochimici (Carbonio, Azoto e Zolfo)</i>	<i>Pag. 7</i>
<i>2 - Descrizione dei Bacini Anossici Ipersalini Profondi (DHABs)</i>	<i>Pag. 11</i>
<i>3 - L'Atalante</i>	<i>Pag. 13</i>
<i>4 - Medea</i>	<i>Pag. 14</i>
<i>5 - Scelta dei geni funzionali</i>	<i>Pag. 16</i>
<b>6 - Attività dei geni target</b>	<b>Pag. 17</b>
6.1 <i>amoA</i>	<i>Pag. 17</i>
6.2 <i>ure</i>	<i>Pag. 17</i>
6.3 <i>cbbL</i>	<i>Pag. 18</i>
6.4 <i>mcr</i>	<i>Pag. 19</i>
6.5 <i>dsrAB, aps, apr</i>	<i>Pag. 19</i>
6.6 <i>16S rRNA</i>	<i>Pag. 20</i>
<b>7 - Metodologia proposta</b>	<b>Pag. 22</b>
<b>8 - Microarray</b>	<b>Pag. 22</b>
8.1 <i>Descrizione della tecnica</i>	<i>Pag. 24</i>
8.2 <i>Vantaggi della tecnica microarray</i>	<i>Pag. 25</i>
8.3 <i>Classificazione dei Chip</i>	<i>Pag. 26</i>
8.4 <i>FGAII (GeoChip)</i>	<i>Pag. 26</i>
<b>INTRODUZIONE ALLA PARTE SPERIMENTALE</b>	<b>Pag. 29</b>
<b>CAPITOLO 1 – PRIMA FASE</b>	<b>Pag. 31</b>
“Applicazione della tecnica Microarray a campioni provenienti dal bacino anossico L'Atalante”.	
<b>1.1 MATERIALI E METODI</b>	<b>Pag. 31</b>
1.1.1 <i>Campagna di campionamento</i>	<i>Pag. 31</i>
1.1.2 <i>Raccolta dei campioni</i>	<i>Pag. 32</i>
1.1.3 <i>Estrazione degli acidi nucleici</i>	<i>Pag. 33</i>
1.1.4 <i>Purificazione del DNA</i>	<i>Pag. 35</i>
1.1.5 <i>Amplificazione del DNA</i>	<i>Pag. 36</i>
1.1.6 <i>Labeling</i>	<i>Pag. 36</i>
1.1.7 <i>Ibridizzazione</i>	<i>Pag. 37</i>
1.1.8 <i>Scansione e normalizzazione dei dati</i>	<i>Pag. 38</i>
<b>1.2 RISULTATI</b>	<b>Pag. 40</b>
1.2.1 <i>Ibridizzazione geoChip</i>	<i>Pag. 40</i>
1.2.2 <i>Clustering gerarchico</i>	<i>Pag. 42</i>

<b>CAPITOLO 2 – SECONDA FASE</b>	<b>Pag. 45</b>
“Valutazione dell’attività dei geni target nei campioni provenienti dal bacino anossico MEDEA”	
<b>2.1 MATERIALI E METODI</b>	<b>Pag. 45</b>
2.1.1 <i>Campagna di campionamento e raccolta dei campioni</i>	<i>Pag. 45</i>
2.1.2 <i>Trattamento e trascrizione inversa dell’RNA</i>	<i>Pag. 49</i>
2.2.3 <i>Amplificazione dei campioni di cDNA e DNA</i>	<i>Pag. 50</i>
2.1.3 <i>OneStep RT-PCR</i>	<i>Pag. 50</i>
<b>2.2 CLONAGGIO E SEQUENZIAMENTO</b>	<b>Pag. 51</b>
2.2.1 <i>Ligazione</i>	<i>Pag. 51</i>
2.2.2 <i>Trasformazione e sequenziamento</i>	<i>Pag. 51</i>
2.2.3 <i>Analisi filogenetiche</i>	<i>Pag. 52</i>
<b>2.3 RISULTATI</b>	<b>Pag. 53</b>
2.3.1 <i>Analisi filogenetiche del 16s rRNA</i>	<i>Pag. 53</i>
2.3.2 <i>Analisi filogenetiche dei geni funzionali</i>	<i>Pag. 53</i>
<b>CAPITOLO 3 – TERZA FASE</b>	<b>Pag. 62</b>
“Progettazione del DHABs chip”	
<b>3.1 Progettazione del Chip 50mer (Li et. al, 2005)</b>	<b>Pag. 63</b>
<b>3.2 Descrizione dei parametri</b>	<b>Pag. 63</b>
3.2.1 <i>Scelta dei target</i>	<i>Pag. 63</i>
3.2.2 <i>Ibridizzazione incrociata e self-annealing</i>	<i>Pag. 63</i>
3.2.3 <i>Identità di sequenza</i>	<i>Pag. 64</i>
3.2.4 <i>Energia libera di legame</i>	<i>Pag. 64</i>
3.2.5 <i>Temperatura di melting <math>T_m</math></i>	<i>Pag. 64</i>
3.2.6 <i>Qualità e ottimizzazione delle sonde</i>	<i>Pag. 64</i>
<b>3.3 Chip 50mer DHABs</b>	<b>Pag. 65</b>
<b>CONCLUSIONI</b>	<b>Pag. 83</b>
<b>RINGRAZIAMENTI</b>	<b>Pag. 85</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>Pag. 86</b>

## PREMESSA

La vita sulla terra è inestricabilmente legata alle interazioni con l'ambiente ed alle sue modificazioni. Ciò è particolarmente vero per gli oceani ed i mari che nel loro insieme ricoprono il 70% della superficie terrestre. Tale estensione, unita alle sue caratteristiche fisiche, chimiche e biologiche fa sì che l'ambiente marino agisca come un sistema recettore, con un'ampia possibilità di memoria per le modificazioni ambientali dovute a fenomeni naturali o indotti dall'uomo, e al contempo capace di reagire prontamente con risposte a breve ed a lungo termine.

La prima chiara evidenza dell'interazione tra esseri viventi e ambiente è l'interscambio di sostanza organica ed inorganica che ciclicamente va a comporre la parte vivente e quella non vivente della terra.

Il trasporto e la trasformazione delle sostanze nell'ambiente attraverso la vita, l'aria, la terra, acqua e ghiaccio sono complessivamente noti con il nome di cicli biogeochimici: questi, insieme agli organismi viventi interpreti di tali processi, sono i primi a subire l'influenza delle modificazioni ambientali.

Tipicamente, i feedback direttamente registrabili sono quelli che avvengono a carico delle comunità viventi marine e, in particolare, dei microrganismi i quali hanno un ciclo vitale breve (facilmente controllabile) e, sono inoltre dotati di elevate specializzazioni talvolta uniche e correlabili con una specifica causa.

I batteri marini consumano il 75% del carbonio particolato (sink) sospeso nei primi 500m della colonna d'acqua, e sono responsabili del ricircolo dei principali elementi di cui sono costituiti gli organismi viventi (C, H, N, S, P) attraverso successioni di organicazione e mineralizzazione.

Il completo riciclo degli elementi essenziali costituisce il **ciclo biogeochimico** dell'elemento.

In particolare, processi quali, azoto-fissazione, respirazione anaerobica, chemolitotrofia, nitrificazione, sono mediati esclusivamente dai microrganismi.

I cicli biogeochimici sui quali si è puntato l'interesse sono quelli relativi al carbonio, l'azoto e lo zolfo che costituiscono la base delle principali attività delle comunità microbiche marine.

Le profondità oceaniche costituiscono uno dei più importanti e meno conosciuti ecosistemi microbici marini, gli oceani profondi occupano i due terzi della superficie del pianeta con una profondità media che si aggira intorno ai 3800 m, questi luoghi sono caratterizzati da una totale assenza di luce, sono inoltre zone oligotrofiche nelle quali la pressione aumenta rapidamente e la temperatura invece diminuisce raggiungendo anche i 2°C, alcune zone sono anche caratterizzate da una totale assenza di ossigeno (Cuadrado et. al, 2007).

In una tale realtà è difficile immaginare la vita, ma al contrario di quanto si possa pensare questi non sono luoghi biologicamente inerti, ma costituiscono gli habitat per organismi unici e altamente specializzati che giocano un ruolo chiave nei cicli biogeochimici. La maggior parte della sostanza organica proveniente dalla morte degli organismi marini, infatti, sedimenta e si accumula nelle profondità oceaniche. I composti essenziali per la vita sul nostro pianeta non sarebbero più reperibili se gli ambienti marini profondi fossero dei luoghi sterili.

Le attività mediate dai microrganismi in questi ambienti, inoltre, influenzano la produttività dei mari profondi e il bilancio dei gas causa dell'effetto serra nell'atmosfera.

Non bisogna dimenticare anche che le profondità oceaniche sono una miniera di minerali, gas, petrolio e sostanze bioattive.

Anche le aree marine anossiche, con particolare riferimento ai bacini anossici iperalini profondi (DHABs) giocano un ruolo fondamentale nei cicli biogeochimici che si espletano all'interno degli oceani, essendo luogo di un'attiva solfato riduzione/ossidazione, metanogenesi e ossidazione di ferro e manganese. Oltre alle già citate condizioni di elevata pressione, assenza di luce e di ossigeno, presentano elevate concentrazioni di sali (10 volte superiore all'acqua di mare), e concentrazioni ioniche variabili.

Tutte queste caratteristiche unite alla poca conoscenza delle profondità oceaniche hanno aumentato negli ultimi anni l'interesse verso lo studio di tali ecosistemi.

Al fine di comprendere la dinamica di questi cicli, i fattori che governano l'entità ed il bilancio dei nutrienti nell'acqua e nei sedimenti marini, è necessario ottenere informazioni quantitative o semi-quantitative sulle attività biologiche coinvolte nei cicli biogeochimici. Lo studio dei geni funzionali coinvolti in queste attività può

essere un approccio interessante per la comprensione del ruolo dei microrganismi nel riciclo della sostanza organica.

A questo proposito a supporto delle comuni tecniche di studio biomolecolari è stato proposto l'utilizzo della tecnica microarray.

Questa tecnica è di recente sviluppo ed è ampiamente utilizzata nello studio dell'espressione genica in campo medico che per monitorare i processi ambientali.

Il chip utilizzato in questo studio è un FGAI, denominato anche GeoChip, è stato messo a punto nei laboratori del dipartimento di Genomica Ambientale diretto dal Prof. Zhou, presso l'Università dell'Oklahoma.

Il limite di applicabilità agli ambienti marini dell'FGAI è che è stato progettato sulla base di geni specifici di organismi terrestri o di acqua dolce, nonostante ciò si è voluta applicare la tecnica a campioni marini in modo da poterla apprendere e valutare la possibilità di progettare chip specifici per gli ambienti oceanici profondi ed estremi.

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di monitorare gli ambienti marini profondi, con particolare attenzione ai DHABs, per evidenziare l'attività di alcuni geni target del ciclo del carbonio, dell'azoto e dello zolfo. Considerando che l'espressione di essi è indice di una determinata attività e della presenza di microrganismi specifici, si possono, quindi, ottenere delle informazioni riguardo le vie metaboliche attive in questi luoghi estremi.

Contemporaneamente è stata eseguita l'analisi delle sequenze codificanti per il 16S rRNA in modo da ottenere delle informazioni sulla diversità microbica di questi ambienti. Le sequenze ottenute da queste analisi sono state raccolte ed utilizzate per la progettazione di un chip microarray che contenga geni specifici degli ambienti marini profondi.

## INTRODUZIONE

### *1 - Ambienti marini e cicli biogeochimici (Carbonio, Azoto e Zolfo)*

Le modalità con cui i nutrienti vengono trasferiti fra atmosfera, terra, oceani e le rispettive riserve biotiche possono limitare i tassi di produzione biologica e se allarghiamo il discorso su scala globale il ciclo dei nutrienti influisce, inoltre, sulla concentrazione di CO<sub>2</sub> in mare (Arrigo, 2005).

Gli oceani giocano un ruolo predominante nel ciclo del carbonio, infatti, la quantità totale presente sulla terra è circa 49000 gigatonnellate, delle quali circa il 71% è contenuto negli oceani per lo più sotto forma di carbonati e bicarbonati che a loro volta diventano molto importanti nel controllo del pH, ed un 3% è contenuto nel fitoplancton e nella materia organica.

Il ciclo del carbonio negli oceani ha due componenti principali, una fisica ed una biologica.

La prima è costituita dalla dissoluzione della CO<sub>2</sub> in acqua. Il biossido di carbonio è più solubile in acqua fredda, così alle alte latitudini si accumula in essa e sprofonda entrando a far parte della circolazione profonda, che può essere descritta come una sorta di nastro trasportatore, dove permane per migliaia di anni. Eventuali mescolamenti trasportano la CO<sub>2</sub> verso regioni più calde (tropici) lontane dal luogo di assorbimento, dove grazie alle correnti di upwelling viene trasportata in superficie e rilasciata nell'atmosfera. Questo sistema di correnti oceaniche costituisce *la pompa fisica marina del carbonio*.

La componente biologica è costituita dal fitoplancton che attraverso la fotosintesi lo converte in carboidrati ed ossigeno; dai batteri metanogeni che, nei sedimenti marini, riducono la CO<sub>2</sub> a metano; dai procarioti marini che utilizzano composti organici ridotti per fissare la CO<sub>2</sub> in assenza di luce negli ambienti profondi; da micro-organismi eterotrofi che, sempre in assenza di luce, degradano la sostanza organica proveniente dalla decomposizione degli organismi vegetali ed animali morti restituendola in parte come CO<sub>2</sub>, e in parte come altro metano.

Tutto ciò costituisce la *pompa biologica marina del carbonio* (<http://oceanworld.tamu.edu>), (Fig. 1).

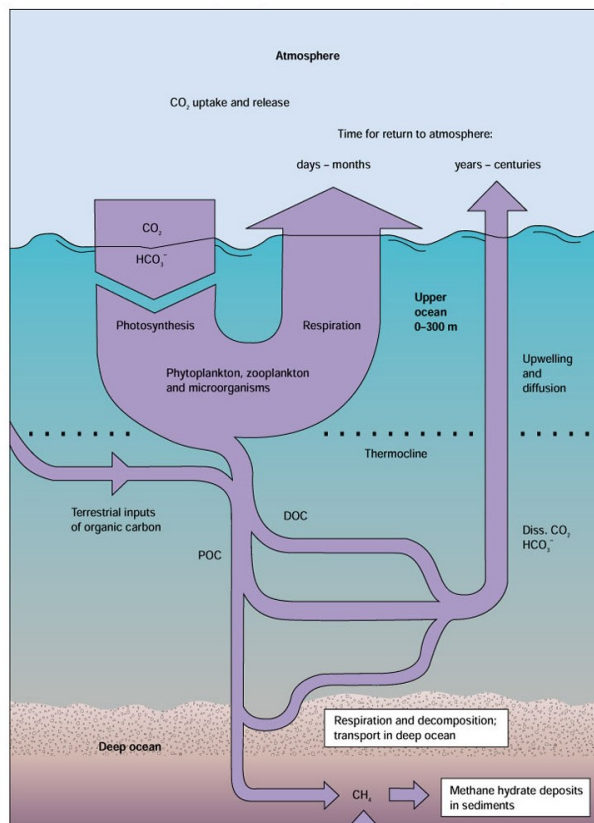


Fig. 1 – Rappresentazione schematica del ciclo del Carbonio in mare. POC: carbonio organico particolato; DON: carbonio organico disciolto

L'azoto è uno dei nutrienti essenziali per gli organismi viventi essendo un componente di biomolecole fondamentali come le proteine e gli acidi nucleici. Praticamente tutti i microrganismi, le piante e gli animali, richiedono azoto combinato con idrogeno, (ammoniaca), o con l'ossigeno (nitrati).

La trasformazione biochimica dell'azoto ha un'influenza notevole sulla produttività biologica degli ambienti marini, basti pensare che la fascia di atmosfera a noi più vicina contiene circa 78% di azoto molecolare, ma in questa forma è piuttosto inerte e solo pochissimi microrganismi sono in grado di utilizzarlo.

La fissazione biologica dell'azoto molecolare avviene per opera dei microrganismi azoto fissatori che, per mezzo dell'enzima dinitrogenasi reductasi rendono disponibile la grande quantità di azoto atmosferico (N<sub>2</sub>), il quale altrimenti non sarebbe direttamente accessibile agli eucarioti e agli altri procarioti.

L'ammoniaca prodotta dalla fissazione dell'azoto e dalla decomposizione della sostanza organica, in condizioni di aerobiosi, viene trasformata in nitrato ad opera



dei batteri ammonio-ossidanti (AOB), essi sono variamente distribuiti ed adattabili alle diverse caratteristiche ambientali, tanto che qualsiasi luogo in cui è presente sostanza organica mineralizzata potrebbe costituire un possibile habitat per gli AOB, (Bock & Wagner, 2001). Recenti studi hanno, inoltre, portato alla luce la capacità del gruppo dei *Crenarchaeota*, organismi che dominano gli ambienti marini profondi, di compiere questa via metabolica, (Francis et al, 2007).

In assenza di ossigeno, invece, è il processo di anammox (ossidazione anaerobia dell'ammoniaca) che restituisce l'azoto molecolare all'atmosfera.

La denitrificazione costituisce la fase di ritorno dell'azoto in atmosfera. I composti ossidati dell'azoto ( $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_2^-$ ) vengono utilizzati come accettori alternativi di elettroni per produrre energia, e ridotti a NO,  $\text{N}_2\text{O}$  e  $\text{N}_2$  che vengono rilasciati contemporaneamente in atmosfera conducendo così ad una perdita in azoto molecolare. Nei sedimenti marini costieri, il 40-50% degli input di azoto inorganico disciolto viene rimosso dalla denitrificazione, (Seitzinger, 1990) sbilanciando così il contenuto di azoto nell'oceano (Codispoti, 1995; Devol, 1991). L'accumulo degli intermedi NO ed  $\text{NO}_2$  contribuisce, inoltre, al riscaldamento globale riducendo lo strato di ozono (Conrad, 1996), (fig. 2).

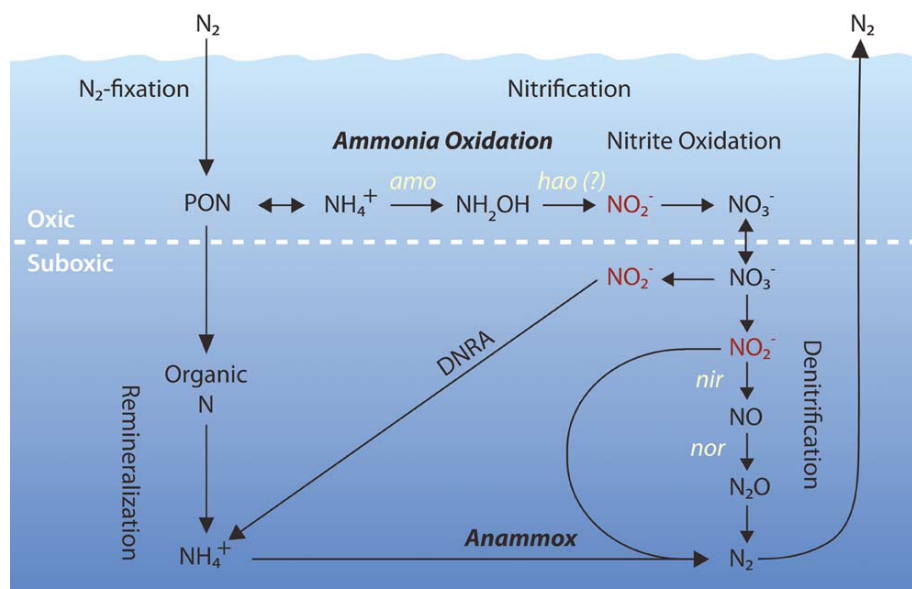


Fig. 2 – Rappresentazione schematica del ciclo dell'azoto in mare. PON: azoto organico particolato; DNRA (dissimilatory nitrato reductasi)

Anche lo zolfo è un costituente essenziale della materia vivente e in ordine di quantità è il quinto elemento sulla terra.

Gli amminoacidi cisteina, metionina, omocisteina e taurina contengono zolfo, come anche alcuni enzimi molto comuni, questo lo rende un elemento indispensabile alla vita di qualsiasi cellula.

I ponti solfuro fra polipeptidi sono estremamente importanti per l'assemblaggio e la struttura delle proteine.

Lo zolfo entra nell'ambiente marino ad opera dei fiumi e delle piogge che lo immettono sotto forma di solfati che vengono utilizzati da batteri e vegetali i quali lo trasferiscono ai livelli trofici superiori. Alla morte degli organismi o a causa dell'escrezione lo zolfo ritorna all'ambiente. Esso tende ad accumularsi nei sedimenti marini profondi. Nella zona meno superficiale del sedimento, in ambiente anaerobio, i solfati vengono ridotti ad idrogeno solforato dai ceppi batterici appartenenti al genere *Desulfobacter*.

La respirazione anaerobia in presenza di solfato è la componente principale del ciclo globale dello zolfo e viene effettuata unicamente dai procarioti (Rabus, et al., 2000), il suo riciclo prevede una serie di trasformazioni mediate da solfo batteri che ne determinano lo stato di ossidazione da  $\text{SO}_4$  ad  $\text{H}_2\text{S}$ .

In alcuni ecosistemi, inclusi i sedimenti marini, i batteri solfato-riduttori (SRB) sono funzionalmente i più importanti (Ravenschlag, et al., 2001; Knoblauch, et al., 1999). Inoltre, costituiscono un grande ed estremamente diverso gruppo fisiologico di microrganismi anaerobi capaci di degradare un ampio range di substrati organici, inclusi i prodotti del petrolio, come gli alcani (Rueter, et al., 1994; So, and Young, 1999), il toluene (Beller, et al., 1996; Rabus, et al., 1993), il benzene (Phelps, et al., 1998) e gli idrocarburi policiclici aromatici (Galushko, et al., 1999; Zhang, and Young 1997).

## 2 - Descrizione dei Bacini Anossici Ipersalini Profondi (DHABs)

I DHABs sono situati in un'area del Mediterraneo denominata Cresta Mediterranea, essa è il risultato della convergenza fra la piattaforma Africana, Europea ed Egea, (fig. 4.1).

I primi bacini ad essere scoperti, e tutt'ora in fase di studio, sono L'Atalante, Discovery, Urania e Bannok, a questi se ne sono aggiunti altri recentemente individuati, Medea e Kryos, e l'ultimissimo in ordine temporale di identificazione, Tethis, scoperto durante la campagna oceanografica MIDDLE che ha avuto luogo sulla nave Urania dal 24 settembre al 6 ottobre 2008, (fig. 3).

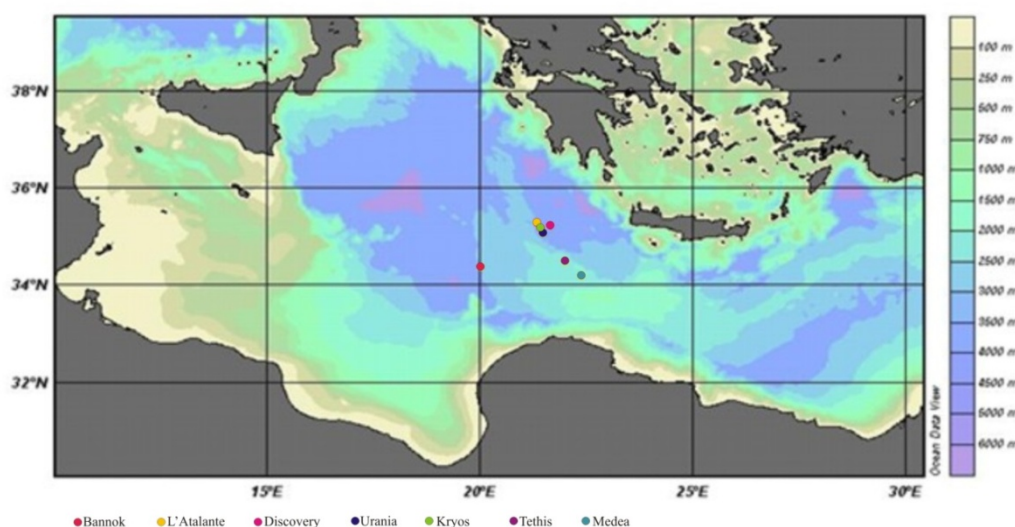


Fig. 3 – Posizione geografica dei bacini anossici.

I bacini ipersalini, probabilmente, sono il risultato dello scioglimento di depositi sotterranei di sale che sono stati esposti all'acqua di mare in seguito ad attività tettoniche avvenute durante il Miocene (da 26 milioni a 2,5 milioni di anni fa).

Le brine racchiuse in questi bacini sono caratterizzate da condizioni di anossia, alta pressione ( $\cong 35\text{MPa}$ ) e concentrazioni sature di sali (Camerlenghi, 1990; Jongsma et al., 1983; Lange et al., 1990; Wallmann, et al., 1997), in particolare elevate concentrazioni di  $\text{MgCl}_2$ , ( $\sim 5\text{ M}$ ; Wallmann et al., 1997; van der Wielen et al., 2005).

L'alta densità della brina limita il mescolamento con le acque sovrastanti ricche di ossigeno, creando un chemiocline dello spessore di 1-3m. Risulta chiaro, da studi già

effettuati che i DHABs hanno delle caratteristiche geochimiche distinte gli uni dagli altri (Camerlenghi, 1990; de Lange et. al, 1990; Henneke et. al, 1990). La brina di L'Atalante, Bannock e Urania, ha una composizione ionica simile, ma la salinità di Urania è minore al contrario della concentrazione di metano e solfati che, invece, è considerevolmente maggiore rispetto agli altri due. La differenza sostanziale con il bacino Discovery sta nella sua elevata concentrazione di ioni  $Mg^{2+}$  (~5M) ed in una minore concentrazione di ioni  $Na^{+}$ .

La separazione fisica con la sovrastante colonna d'acqua e la loro esistenza stimata in migliaia di anni, molto probabilmente hanno reso possibile l'evoluzione di comunità microbiche specifiche e differenti nei vari bacini.

In passato queste elevate concentrazioni di cationi avevano convinto gli studiosi che questa condizione fosse incompatibile con la vita, (Horowitz et al., 1972; Siegel et al., 1979), ma recentemente è stata dimostrata la presenza di comunità microbiche metabolicamente attive.

Attraverso lo studio combinato del 16S rRNA e di test enzimatici è stata dimostrata, in tutti e quattro i bacini, un'attiva riduzione del metano, del solfato ed un'importante un'attività eterotrofa e chemoautotrofa. Al contrario le acque al di sopra di essi mostrano una differente struttura della comunità microbica, (Van der Wielen et al., 2005).

I bacini Medea, Kryos e Tethis sono in fase di studio. In tabella 1 sono elencate le salinità dei DHABs.

<b>Bacino</b>	<b>Salinità Brina gr/100ml</b>
<b>Discovery</b>	<b>58.0</b>
<b>Urania</b>	<b>17.0</b>
<b>Kryos</b>	<b>58.0</b>
<b>Tethis</b>	<b>33.0</b>
<b>Medea</b>	<b>37.0</b>
<b>Atalante</b>	<b>33.0</b>

Tab. 1 – concentrazioni saline dei bacini anossici

### 3 - L'Atalante

Il bacino è stato scoperto durante la campagna oceanografica MEDIRIFF 1993 insieme ad Urania.

E' localizzato nella parte ovest dell'area dei bacini anossici, la brina ha una concentrazione salina pari a 33gr/ml, che rimane costante per tutta la profondità, inoltre è fortemente arricchita in potassio ( $>390$  mmol/l), (fig- 4).

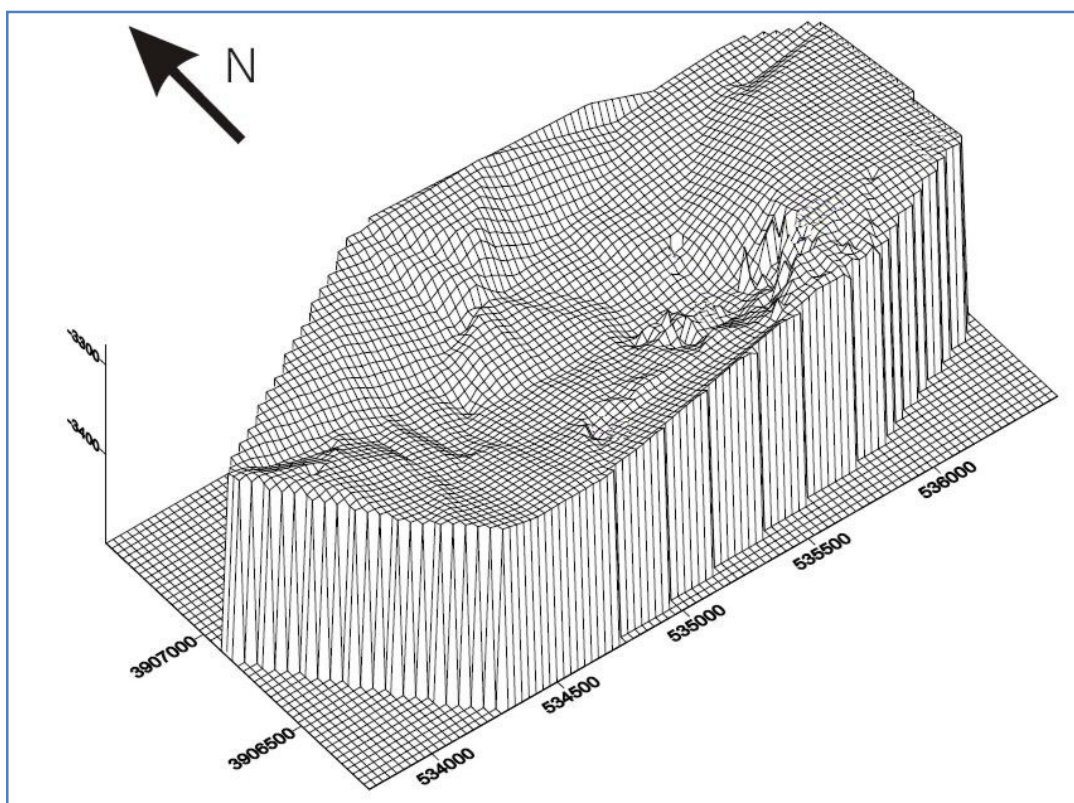


Fig. 4 – Grafico tridimensionale del bacino L'Atalante.

Come per gli altri bacini poco si conosce sull'attività e sul tipo di comunità presenti nella brina. Sappiamo che non è microbiologicamente morto, ma che contiene comunità microbiche attive che contribuiscono al ciclo biogeochimico di carbonio e zolfo, come osservato in altri ecosistemi anossici e ipersalini, (Ollivier, et al., 1994).

In tabella 2 sono mostrate le caratteristiche fisico-chimiche della brina:

L'ATALANTE		mmol/l	mol/l	g/l	%
Densità	1.23				
Temperatura	14.3°C				
Na (mmol/Kg)	3800.00	4674.00	4.67	107.03	10.70
Cl (mmol/Kg)	<u>4300.00</u>	<u>5289.00</u>	<u>5.29</u>	<u>187.50</u>	<u>18.75</u>
Mg (mmol/Kg)	533.00	655.59	0.66	15.94	1.59
K (mmol/Kg)	<u>300.00</u>	<u>369.00</u>	<u>0.37</u>	<u>14.43</u>	<u>1.44</u>
Ca (mmol/Kg)	5.90	7.26	0.01	0.29	0.03
SO <sub>4</sub> (mmol/Kg)	<u>323.00</u>	<u>397.29</u>			
HS <sup>-</sup> (mM)	2.90	3.57			
Br (mM)	5.00	6.15			
B (mM)	4.00	4.92			
Li (mmol/Kg)	76.00	93.48	0.09	0.65	0.06
Sr (mmol/Kg)	34.00	41.82	0.04	3.66	0.37
				Tot	32.95

Tab. 2 – Caratteristiche fisico-chimiche del bacino L'Atalante

#### 4 - Medea

E' stato scoperto durante la crociera Medea nel 1995 (Chamot-Rooke et al., 2005), inizialmente era stato identificato come un vulcano di fango, studi più approfonditi compiuti durante la campagna oceanografica PENELOPE (26 gennaio-5 febbraio 2007) condotta in collaborazione fra francesi, greci e giapponesi sulla nave oceanografica Hakuho Maru, anno evidenziato che invece si trattava di un bacino anossico.

Il bacino è situato a ridosso di una collina subacquea avente un diametro di 6,8Km ed un'altezza di circa 126m e posizionata su un plateau alla profondità di 2263m.

La depressione che accoglie questo bacino ha una lunghezza totale di 50Km, copre un'area di circa 112Km<sup>2</sup> e accoglie 5 sub-bacini di dimensioni, orientamento e profondità variabili. Nel versante ovest sono presenti due bacini la cui profondità si aggira intorno ai 3066 e 3058m. Il versante est, invece, ha una forma a freccia allungata ed ha una profondità di circa 3101m, (Hermes, 2007).



La brina campionata nel bacino ha una salinità di 37gr/ml.

La figura 5a mostra una mappa tridimensionale del bacino, ottenuta dall'elaborazione dei dati raccolti durante la campagna oceanografica MEDBIO2 (Dic, 2007).

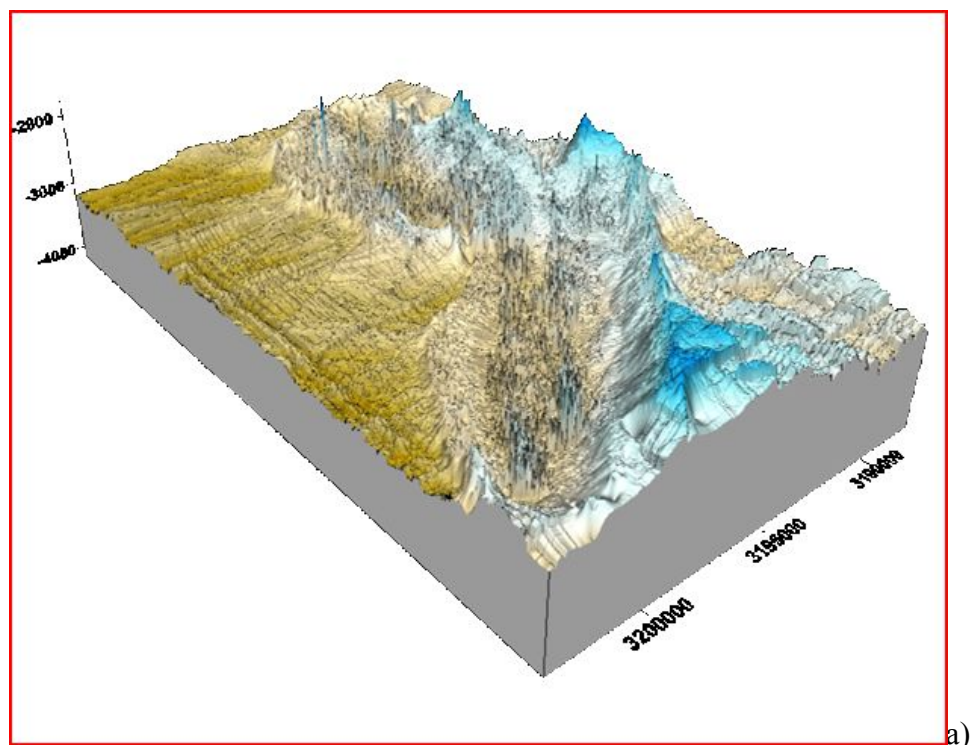


Fig. 5 – a) Mappa tridimensionale del bacino Medea; b) Esempio dell'estensione del bacino.

### ***5 - Scelta dei geni funzionali***

I procarioti marini giocano un ruolo chiave nella fissazione della CO<sub>2</sub> nella zona fotica, sostenendo così, l'attività delle comunità microbiche eterotrofe. Studi recenti hanno evidenziato che l'organicaione dell'anidrite carbonica non avviene solo nelle acque superficiali, ma anche nella zona afotica e nelle profondità oceaniche, (Herndl et al., 2005; DeLong, 2006; Ingalls et al., 2006), dove la totale assenza di luce impedisce la fotosintesi. In questi luoghi sono i processi chemoautotrofi a sostenere la produttività utilizzando l'idrogeno solforato, l'ammoniaca, il metano ed alcuni composti inorganici ridotti che fungono da donatori di elettroni, (Yakimov et. al, 2007).

I bacini anossici ipersalini profondi del Mediterraneo non sono dei luoghi biologicamente morti, ma al contrario contengono comunità microbiche attive che danno un contributo importante al ciclo del carbonio, dell'azoto e dello zolfo, (van der Wielen et. al, 2005). La solfato riduzione e la metanogenesi, infatti, sono due vie metaboliche che avvengono in condizioni di anaerobiosi, e sono ampiamente rappresentate nei bacini anossici. Questi processi vengono espletati principalmente da membri appartenenti, rispettivamente, al gruppo dei Delta-proteobatteri e degli Archaea.

L'ultimo decennio ha identificato il gruppo dei Crenarchaeota come quello dominante negli ambienti profondi afotici, dove rappresenta il 60% del totale del batterioplankton marino, (Yakimov et. al, 2007).

Sebbene il metabolismo di questi archaea sia attualmente in fase di studio, il loro isolamento e le analisi del genoma hanno dimostrato la loro abilità di ossidare l'ammoniaca (Francis et al., 2005; Konneke et al., 2005; Nicol and Schleper, 2006; Wuchter et al., 2006; Hallam et al., 2006a, b). Altri studi hanno, inoltre, dimostrato una prevalenza dei crenarchaea nella fissazione della CO<sub>2</sub>, (Herndl et al., 2005). Questi risultati puntano l'attenzione sul loro ruolo del ciclo del carbonio e dell'azoto, ponendoli in una posizione di rilievo nella produzione primaria, tanto che si ipotizza che negli ambienti profondi, essa sia sostenuta principalmente dai procarioti chemoautotrofi piuttosto che dalla materia organica proveniente dalla zona fotica (Sass et al., 2001).



Al fine di monitorare gli ambienti marini profondi, con particolare interesse verso i DHABs, sono stati scelti come target metabolici i geni *cbbl*, *mcrA*, *dsrAB*, *aps* e *apr*, mentre come marker filogenetico il gene 16S rRNA.

I geni *amoA* e *ure*, pur non essendo stati testati nella seconda fase verranno discussi poiché sono stati inseriti fra i candidati per la progettazione del chip array.

## 6 - Attività dei geni target

### 6.1 *amoA*

Il gene *amoA* codifica per l'ammonio mono-ossigenase (AMO) che è l'enzima chiave nell'ossidazione dell'ammonio. Esso catalizza la conversione dell'ammoniaca in idrossilammina (convertita poi in nitrito dall'idrossilammina ossido reduttasi). Questo enzima è composto da tre subunità, prodotti dei geni *amoA*, *amoB* e *amoC* ed è funzionalmente legato all'enzima metano monoossigenasi (pMMO) dei batteri metano-ossidanti, (Holmes et. al 1995, Nicol et. al 2006), (fig 7).

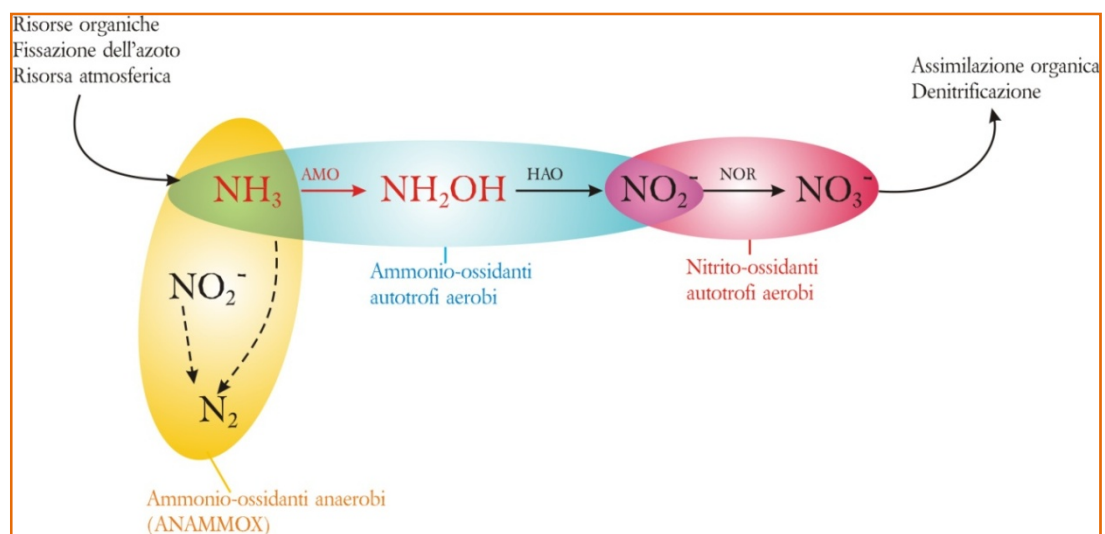


Fig. 7 – Rappresentazione schematica delle vie metaboliche associate al gene *amoA*.

### 6.2 *ure*

Molti batteri ammonio ossidanti utilizzano l'urea per la crescita chemolitotrofica. L'enzima è composto da tre subunità codificate dai geni *ureA*, *ureB* e *ureC* e richiede un massimo di quattro proteine accessorie per l'attivazione e

l'incorporazione di nichel come cofattore, codificate dai geni *ureD*, *ureE*, *ureF*, e *ureG*, (Koper et. al, 2003).

### 6.3 *cbbL*

La RuBisCo (ribulosio bifosfato carbossilasi/ossigenasi), è l'enzima più abbondante sulla Terra esso catalizza la prima tappa del ciclo di Calvin-Benson ossia la fissazione della CO<sub>2</sub>, secondo la reazione:

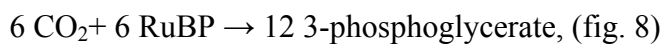


Fig. 8 – Rappresentazione schemati dell'organizzazione della CO<sub>2</sub>

In natura esiste in due forme I e II, la prima è la più comune negli organismi fotosintetici, compresi i batteri autotrofi. E' un esadecamero composto da otto subunità grandi catalitiche, altamente conservate, codificate dal gene *cbbL*, e otto subunità piccole la cui funzione non è ancora chiara, codificate dal gene *cbbS*. La forma II, invece, è costituita da sole subunità grandi il cui numero varia da due ad otto, in base all'organismo, ed è codificata dal gene *cbbM*, (Miziorko et al, 1983; Tabita, 1988).

Le subunità catalitiche delle due forme, I e II, sono biochimicamente distinte e conservano solo il 25% di omologia di sequenza, (Nargang et. al, 1984).

Alcuni batteri possiedono entrambe le forme di questo enzima.

#### 6.4 *mcr*

Tutti gli Ordini di metanogeni conosciuti utilizzano l'enzima metil coenzima M reduttasi per catalizzare l'ultimo step della metanogenesi. In questa ultima tappa un gruppo metilico legato al Coenzima M viene ridotto e come conseguenza si ha il rilascio del metano. L'enzima è composto da tre subunità,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  codificate, rispettivamente, dai geni *mcrA*, *mcrB* ed *mcrG*, (Lloyd et. al, 2006), (fig. 9).

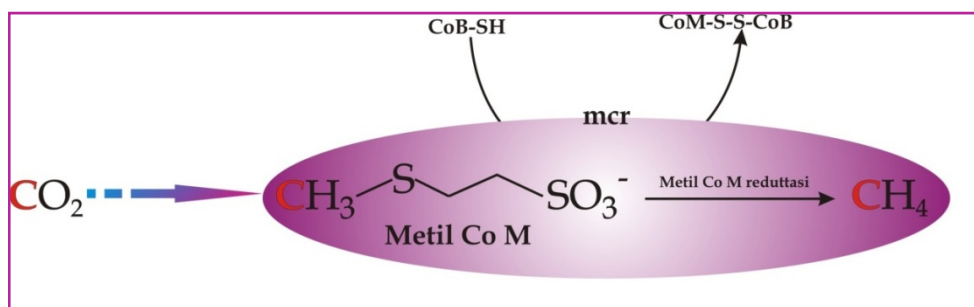


Fig. 9 – Rappresentazione schematica dello step finale della metanogenesi.

#### 6.5 *dsrAB*, *aps*, *apr*

Gli SRB riducono il solfato a solfito utilizzando una varietà di donatori di elettroni, incluso l' $\text{H}_2$ , gli acidi grassi, gli alcoli ed i composti aromatici (Widdel, and Bak 1992).

Il gene *dsrAB* codifica per l'enzima che catalizza lo step finale della riduzione del solfato, la solfito reduttasi (Dissimilatory Sulfite Reductase, DSR). Questo enzima è sintetizzato da tutti i solfato-riduttori conosciuti (Wagner, et al., 1998) ed è composto da due subunità,  $\alpha$  e  $\beta$ , la sua ubiquità e la sequenza altamente conservata lo hanno reso ideale per la valutazione della biodiversità negli ambienti anossici.

I geni *aps* e *apr*, codificano rispettivamente per l'adenosina-59-fosfosolfato reduttasi e per l'APS reduttasi.

I tre geni nel loro insieme sono responsabili della completa riduzione del solfato ad idrogeno solforato ( $\text{H}_2\text{S}$ ), secondo la reazione mostrata in figura 10.

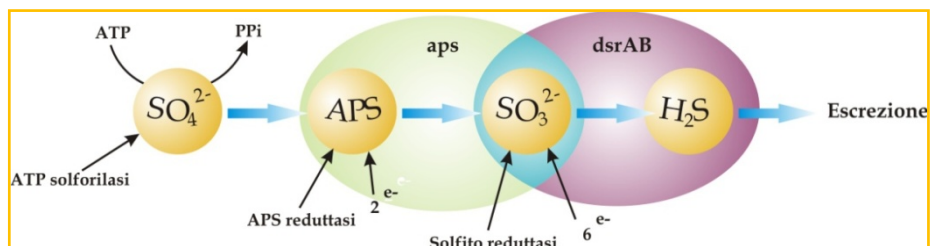


Fig. 10 – Step finale della riduzione del solfato.

### 6.6 16S rRNA

E' un gene lungo circa 1542pb, codifica per la sub unità piccola del ribosoma procariote. Dopo la trascrizione, per assolvere la sua funzione, deve assumere una determinata struttura secondaria. Ha un basso tasso di mutazione, infatti, la maggior parte di esse produce dei ribosomi non funzionanti.

Questo gene è un vero e proprio orologio molecolare e per questo è il più usato per studiare la filogenesi e identificare i batteri.

Nella sequenza del gene 16S rRNA si riconoscono diverse regioni:

- 1) Regioni CONSERVATE universali, che hanno la stessa sequenza in tutti i batteri;
- 2) Regioni SEMICONSERVATE, che hanno sequenza uguale tra batteri dello stesso taxon;
- 3) Regioni VARIABILI, che hanno la stessa sequenza tra batteri appartenenti alla stessa specie.

Confrontando la sequenza del gene in diversi batteri è possibile quantificarne la distanza filogenetica, determinando a che punto dell'evoluzione due organismi si sono differenziati; definire la diversità tra gli organismi in oggetto di studio e identificare un batterio, se due organismi hanno un 16S rRNA con più del 97% delle basi omologhe appartengono alla stessa specie, (fig. 11).

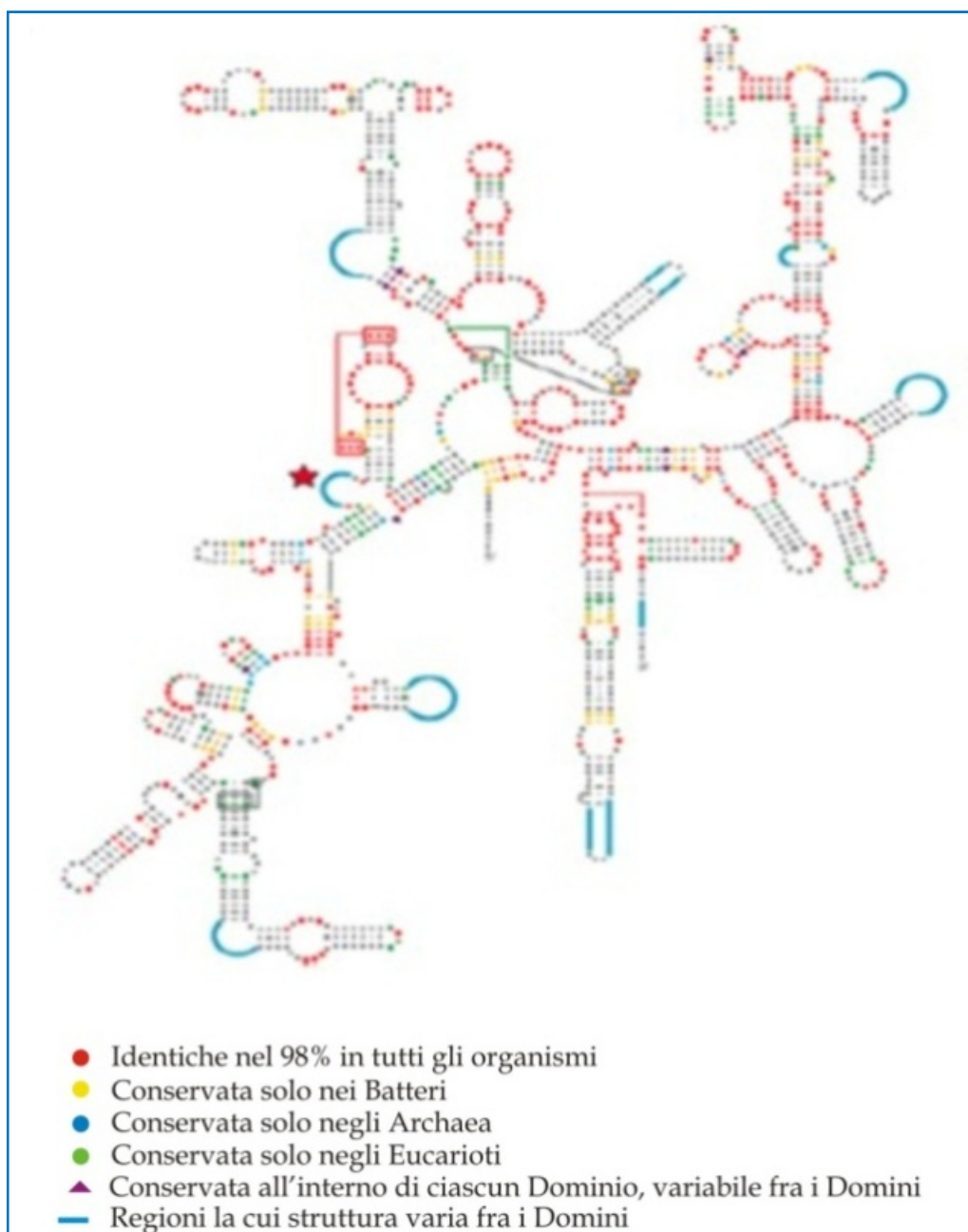


Fig. 11 – Struttura del gene 16SrRNA

## **7 - Metodologia proposta**

I metodi di studio della diversità microbica ambientale possono essere distinti in quelli che puntano sulla comunità totale (composizione, abbondanza, ecc.) e quelli che focalizzano l'attenzione sulle specie o sui geni di interesse. Questi ultimi rappresentano un potente mezzo per definire il ruolo di un gene o di un microrganismo all'interno di una comunità microbica o di un ciclo biologico, per studiarne cioè, la *funzione*.

La maggior parte dei microrganismi non è coltivabile in laboratorio (è stato calcolato che solo 0,1% della comunità microbica marina è coltivabile). Per aggirare questo problema, i microbiologi hanno sviluppato degli approcci di studio coltura-indipendenti come i metodi molecolari basati sullo studio e la caratterizzazione genetica (tassonomica e funzionale) delle comunità microbiche naturali. Recentemente, la creazione ed il sequenziamento di librerie genomiche di grandi inserti di DNA, come per esempio il cromosoma batterico artificiale (BAC), conosciute con il termine di librerie METAGENOMICHE, ha rivoluzionato gli studi (coltura-indipendenti) della diversità microbica, (Rondone et al., 2000). Le informazioni derivanti da queste librerie sono infatti di natura funzionale.

Le informazioni di natura filogenetica e tassonomica sono facilmente ottenute mediante lo studio del 16SrRNA, l'analisi della sequenza di questo gene si basa sul fatto che contiene delle regioni conservate, semiconservate e variabili che permettono di fare una distinzione fra batteri che appartengono allo stesso taxon o alla stessa specie. In questo modo si può avere un'idea sul tipo di comunità che popolano un determinato habitat.

Una tecnologia all'avanguardia, di recente applicazione, che consente lo studio contemporaneo di centinaia di geni è la tecnica del microarray, (Zhou et al., 2004), questa tecnica di studio verrà approfondita nel paragrafo successivo.

## **8 - Microarray**

Il microarray (o microchip) costituisce un potente strumento d'indagine che si è sviluppato velocemente negli ultimi anni, allo stesso modo di come il microprocessore ha rivoluzionato la velocità di computazione, i microchip hanno rivoluzionato le analisi genetiche dei sistemi biologici.

Un chip microarray può essere definito come una matrice ordinata contenente un ampio set di sequenze di DNA fissate su un supporto solido utilizzando un'apparecchiatura automatizzata, in modo che ad ogni spot corrisponda un unico DNA, (Schena et. al 1998), (fig. 12).

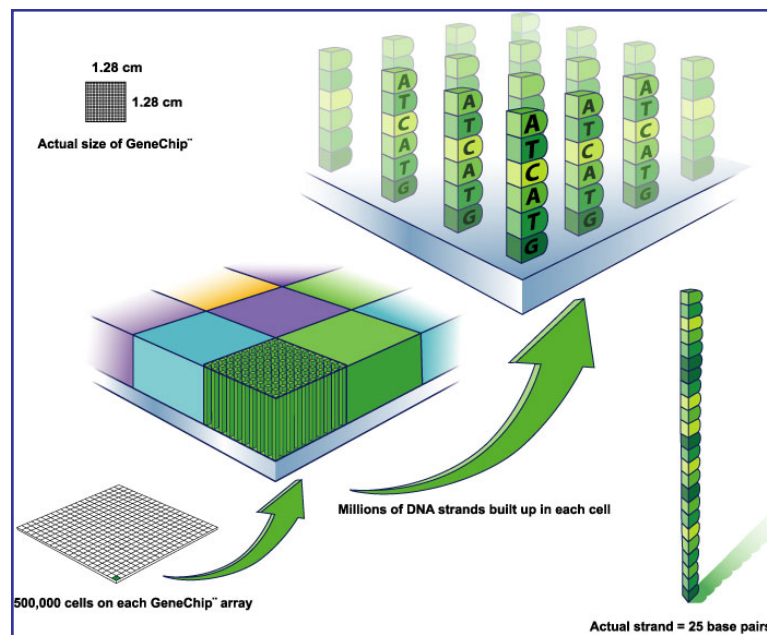


Fig. 12 – Struttura schematica di un chip microarray.

Il principio di funzionamento si basa sull'ibridizzazione di una molecola di DNA a singolo filamento marcata con un fluorocromo (DNA target), con una molecola complementare (DNA sonda) attaccata ad un supporto solido che generalmente è di vetro.

Il substrato utilizzato per la costruzione dei chip ha un grande impatto sull'intero esperimento. Un trattamento sbagliato della superficie può causare un inefficiente legame del DNA, mentre una superficie non uniforme provoca delle variazioni nella quantità di DNA che si ibridizza.

I materiali utilizzati si dividono in due categorie: porosi e non porosi. Quelli non porosi sono preferiti per la maggior parte degli esperimenti microarray. A causa delle caratteristiche del vetro (piccola diffusione, bassa fluorescenza), può essere ridotto a dimensioni molto piccole ed ha una buona affinità con le operazioni di marcatura fluorescente e rilevazione del segnale. Inoltre, permette di depositare quantità molto

piccole di molecole in posizioni precise. Come risultato l'ibridizzazione avviene con delle rese più alte e ad una maggiore velocità perché non ci sono inibizioni steriche e le molecole non devono diffondere attraverso i pori, ciò che succede invece con i materiali porosi.

Gli svantaggi di questi substrati sono l'affinità nei confronti della polvere e degli altri contaminanti aerei ed una ridotta sensibilità rispetto ai substrati porosi che hanno una superficie di attacco maggiore, (Zhou et. al 2004).

### ***8.1 Descrizione della tecnica***

Un tipico esperimento microarray per monitorare l'espressione genica si svolge come segue. Una volta definito lo scopo dello studio si procede all'isolamento degli acidi nucleici, (DNA o RNA), per colture pure o studi clinici generalmente si usa l'RNA in quanto fornisce informazioni sui batteri metabolicamente attivi. L'RNA isolato dalle cellule batteriche e l'RNA di controllo vengono marcati fluorescentemente, con Cy3 e Cy5. Questi due fluorocromi hanno picchi di eccitazione rispettivamente di 550 e 649nm e picchi di emissione di 570nm (verde) e 670nm (rosso). Generalmente la marcatura avviene via trascrizione inversa, prima dell'ibridizzazione.

Quindi il microarray viene ibridizzato con il cDNA marcato, (fig. 13).

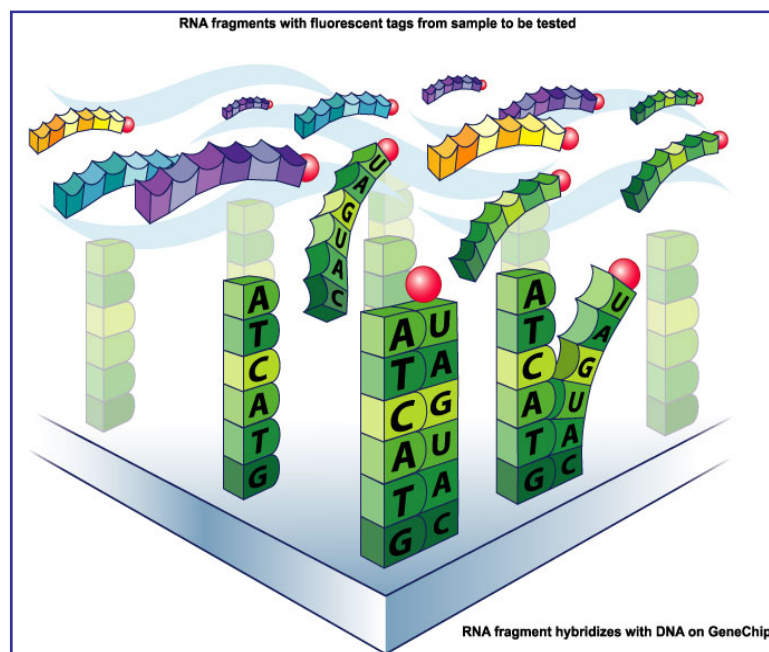


Fig. 13 - Ibridizzazione



Terminata la fase di ibridizzazione il chip viene sottoposto a scansione laser, questo provoca l'emissione di fluorescenza da parte dei due fluorocromi.

L'intensità della colorazione dello spot (verde Cy3 e rossa Cy5) riflette la relativa abbondanza del gene target. Dalla sovrapposizione dei due colori si ottiene uno spot giallo, ciò vuol dire che il gene in questione è ugualmente espresso nei due campioni (ambientale e controllo), (fig. 14).

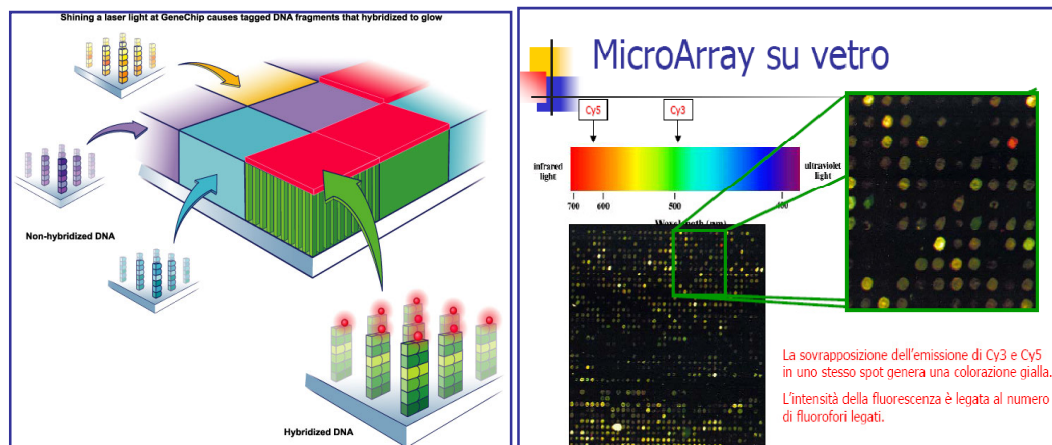


Fig. 14 – Rilevamento spot

La successiva processazione dell'immagine ottenuta è molto importante per una corretta interpretazione dei risultati, infatti, gli spot d'intensità insufficiente e le fluorescenze aspecifiche devono essere eliminate prima dell'analisi dei dati. Qualità e integrità dello spot sono assegnate in base alla dimensione, alla forma, all'omogeneità e all'intensità.

## 8.2 Vantaggi della tecnica microarray

I vantaggi di questa tecnica rispetto agli approcci convenzionali sono:

**1) ALTA PRESTAZIONE.** Si possono analizzare simultaneamente milioni di geni, (un microchip di cDNA ne può contenere anche 30000);

**2) ALTA SENSIBILITA'.** L'alta sensibilità viene ottenuta perché la quantità di DNA sonda è minima ed il DNA target è limitato ad una piccola zona circoscritta, questo fa sì che ci sia un'elevata concentrazione di campione ed un'alta cinetica di ibridizzazione (Shalon et al., 1996; Guschin et al., 1997a);

**3) VISUALIZZAZIONE DIFFERENZIATA.** Differenti target possono essere marcati con differenti fluorocromi ed essere così ibridizzati in parallelo (Salon et al., 1996; Ramsay, 1998);

**4) BASSO RUMORE DI BACKGROUND.** I composti organici e fluorescenti che si attaccano al chip durante la fabbricazione e l'uso possono essere rimossi rapidamente (Salon et al., 1996);

**5) ANALISI DEI DATI IN TEMPO REALE**

**6) AUTOMAZIONE** (Salon et al., 1996).

### ***8.3 Classificazione dei Chip***

Secondo Zhou (2004), i chip microarray utilizzati per gli studi ambientali possono essere divisi in tre classi sulla base del tipo di sonda utilizzata:

**2) FGAs (functional gene arrays):** contengono sonde che corrispondono ai geni che codificano per gli enzimi chiave coinvolti nei processi ambientali. L'FGAII o GeoChip verrà descritto dettagliatamente di seguito in quanto oggetto del mio studio;

**3) CGAs (community genome arrays):** costruiti utilizzando l'intero DNA genomico isolato da microrganismi in coltura pura, forniscono delle informazioni riguardo la componente coltivabile della comunità microbica;

**4) Phylogenetic oligonucleotide arrays:** costruiti con corti oligonucleotidi sintetici provenienti da geni che codificano per l'rRNA vengono utilizzati per l'analisi filogenetica dei campioni ambientali.

### ***8.4 FGAII (GeoChip)***

Adattare la tecnica microarray allo studio ambientale rappresenta una vera e propria sfida in termini di progettazione delle sonde, coverage genico, specificità e sensibilità (Loy et al., 2002; Taroncher-Oldenburg et al., 2003; Rhee et al., 2004; Steward et al., 2004; Tiquia et al., 2004; Wu et al., 2006a).

Per cercare di aggirare questi ostacoli è stato messo a punto un particolare FGA, chiamato GeoChip (Taroncher-Oldenburg et al., 2003; Rhee et al., 2004; Steward et al., 2004; Tiquia et al., 2004).

Il GeoChip contiene 24243 sonde oligonucleotidiche, della lunghezza di 50bp ciascuna, che hanno come target più di 150 gruppi funzionali di oltre 10000 geni

essenziali nei cicli biogeochimici del carbonio, azoto, fosforo e zolfo, nella degradazione dei contaminanti organici e nella riduzione dei metalli. Inoltre, per verificare l'ibridizzazione, sono stati aggiunti degli spot di controllo: 16S rRNA come controllo positivo e per allineare la griglia (192 sonde); spot di controllo qualitativo e quantitativo provenienti da 10 geni umani (960 sonde); bianchi, (He et al., 2007).

Ogni vetrino è organizzato in un'area, sulla quale sono “stampati” tutti i geni, che prende il nome di metagriglia. Ogni metagriglia è divisa in 4x12 subgriglie, ogni subgriglia a sua volta è divisa in 24 righe e 24 colonne, ogni “spazio” corrisponde ad un gene. In posizione colonna 24 (righe 1 e 2) e colonna 1 (righe 17 e 18), sono posizionati degli spot di riferimento (16S rRNA) che vengono utilizzati per allineare la griglia durante la fase di elaborazione dei dati (fig. 15).

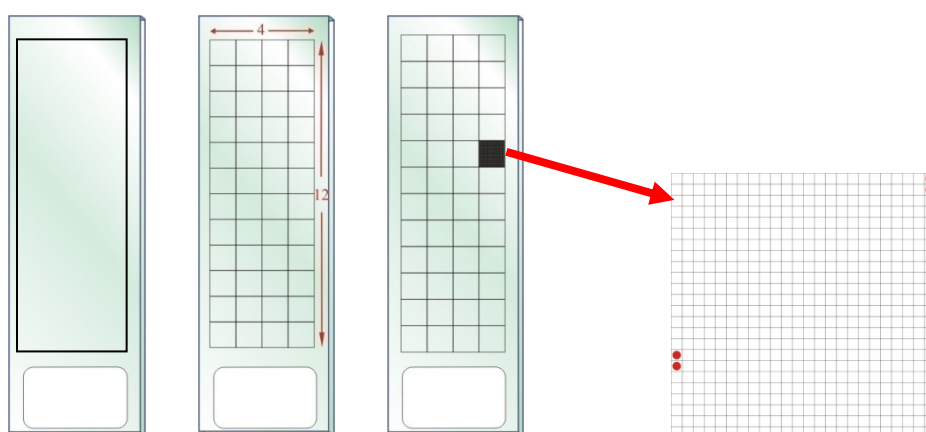


Fig. 15 - a) Metagriglia

b e c) Subgriglie

d) Spot di riferimento

Per ogni gene considerato sono stampate sul vetrino due o tre sonde oligonucleotidiche della lunghezza di 50bp opportunamente scelte all'interno del gene stesso (fig. 16).

I criteri di scelta delle sonde verranno spiegati più avanti.

ACGCACTGGAAGCACGGTGGTATTGTTGGTGTGTTTGGGTATGGTGGCGGCGTCA  
TTGGTCGTTATTCGGACCTACAGGAACAATTCCTTCCGTTGCCCATTTCCACACC  
ATGC **GCGTTAATCAGCCTATGAGCAAGTATTACAACACGGACTATCTCAGGTGTA**  
**TCTGTGACCTGTGGGTGTACCGGGGCAGCGGTCTGATGAATATGCACGGTTCTAC**  
**AGGGGATATTATTTTCCTGGGAACAACCTACAGAGCAGTTGGAGCCCGTCTTTTAT**  
**GAGTTGGGTCATGTACTTCAGCAGGACCTGGGCGGATCGGGATCCAATTTACGGT**  
**CCCCTTCCTGCTGTCTGGGCAAGTCACGG**TGTGAATGGTCATGTATTGACACACA  
GGATATGTGCTATGAACTGACCCACTACTACCAGGATGAGCTGCATCGTCCCGCC

Fig. 16 – Esempio di sonde oligonucleotidiche scelte all'interno del gene.

## INTRODUZIONE ALLA PARTE SPERIMENTALE

L'uso del GeoChip per la prima volta in ambienti marini caratterizzati da parametri estremi richiedeva una prima ottimizzazione della tecnica su campioni mai testati, seguita da analisi specifiche per i target ricercati, per tale ragione il lavoro è stato eseguito in tre fasi:

- 1) Nella prima fase è stato eseguito il campionamento nel bacino anossico L'Atalante. Campioni di Brina, di Interfaccia e di acqua profonda (3400m) sono stati studiati mediante l'applicazione della tecnica microarray presso l'Istituto di Genomica Ambientale dell'Università dell'Oklahoma, (USA).
- 2) Nella seconda fase è stato eseguito il campionamento sul DHAB Medea e sulle acque profonde sovrastanti, le acque campionate sono state sottoposte ad uno screening di geni target del ciclo dell'azoto, dello zolfo e del carbonio, la cui attività è stata evidenziata dall'analisi microarray. È stato, inoltre, eseguito uno studio sul gene 16S rRNA per ottenere delle informazioni sulla diversità microbica di questi ambienti.
- 3) Nell'ultima fase del lavoro le informazioni tassonomiche/funzionali raccolte durante i campionamenti, unitamente agli studi eseguiti negli anni passati su tutti i bacini, sono state utilizzate per progettare un chip in silico contenente geni specifici degli ambienti marini profondi e dei DHABs.

Nella prima fase è stato scelto come sito di campionamento il bacino anossico L'Atalante; la scelta è caduta su un bacino già studiato per la composizione della comunità microbica e le caratteristiche chimico-fisiche. Ciò ha consentito di avere una diretta conferma dei risultati ottenuti con il chip favorendo la scelta dei geni funzionali la cui attività (risultata positiva sul bacino L'Atalante) doveva essere valutata nel nuovo bacino MEDEA. Le informazioni collezionate nella prima e nella seconda fase sono servite come base, o meglio come DATABASE, per la progettazione di un chip in silico, cioè di un chip virtuale contenente i geni specifici dei bacini profondi.

Le sequenze dei geni funzionali e del gene 16S rRNA, raccolte dalle analisi eseguite in questo lavoro e dagli studi fatti negli anni passati, sono state sottoposte a un successivo screening atto a scegliere le sonde da inserire nel chip.

La fase di collezionamento delle sequenze è ancora in corso e procederà aggiungendo le informazioni che via via si otterranno dallo studio dei nuovi bacini, Kryos e Thetis.

Le tre fasi, comprese di risultati, verranno descritte nei capitoli che seguono secondo l'ordine:

- CAPITOLO 1: *Prima fase* – Applicazione della tecnica Microarray a campioni provenienti dal bacino anossico L'Atalante.
- CAPITOLO 2: *Seconda fase* – Valutazione dell'attività dei geni target nei campioni provenienti dal bacino anossico MEDEA.
- CAPITOLO 3: Terza fase – Progettazione del DHABs chip.

## CAPITOLO 1 – I FASE

*“Applicazione della tecnica Microarray a campioni provenienti dal bacino anossico L’Atalante”.*

### 1.1 MATERIALI E METODI

#### 1.1.1 Campagna di campionamento

La scelta dei siti di campionamento è avvenuta nell’ambito della campagna MEDBIO06, che ha avuto luogo sulla nave Oceanografica Urania, dal 28 settembre all’8 novembre 2006.

L’attività principale della campagna ha interessato misure idrologiche e analisi di campioni d’acqua relativi all’intera area del mar Mediterraneo.

La campagna è stata divisa in tre Leg:

PORTI	PARTENZA/ ARRIVO	NOME CAMPAGNA	ZONA DI LAVORO
MESSINA PALERMO	28/09-07/10	MEDBIO06 1°LEG	MEDITERRANEO ORIENTALE (BACINO ANOSSICO L’ATALANTE) CANALE DI SICILIA
PALERMO CIVITAVECCHIA	08/10-27/10	MEDBIO06 2°LEG	MEDITERRANEO OCCIDENTALE GIBILTERRA-OCEANO ATLANTICO
CIVITAVECCHIA NAPOLI	28/10-08/11	MEDBIO06 3°LEG	TIRRENO-CANALE DI SARDEGNA

Il campionamento da me effettuato è avvenuto durante il 1° Leg.

La nave oceanografica Urania è salpata dal porto di Messina il 28/09/2006 alle ore 16:00, in direzione della stazione Atl. (fig. 17) dove sono stati effettuati i campionamenti.

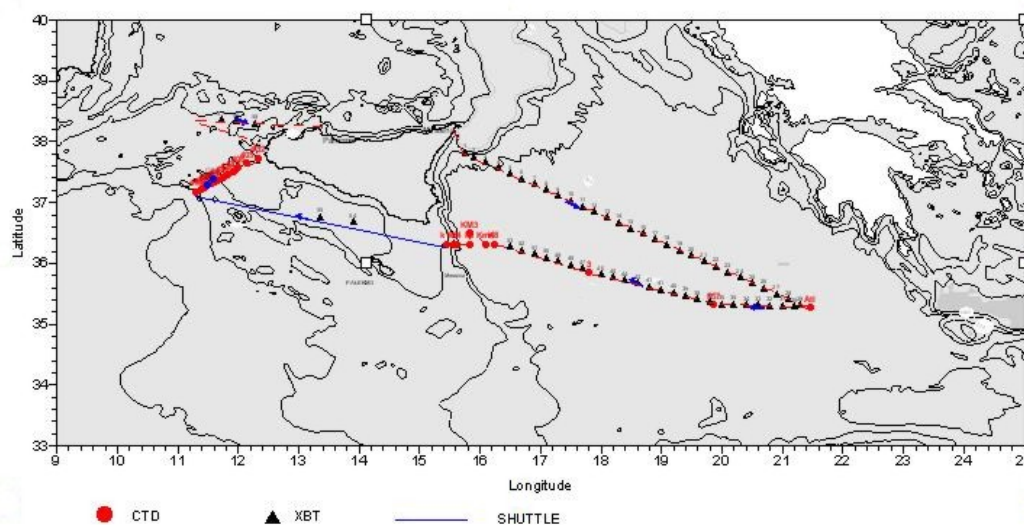


Fig. 17 – Cartina campagna oceanografica MEDBIO06-1° Leg

### 1.1.2 Raccolta dei campioni

I campioni sono stati prelevati all'interno del bacino L'Atalante (Brina), nella zona di Interfaccia e immediatamente al di sopra del bacino stesso.

Il campionamento è stato effettuato mediante una rosetta equipaggiata con bottiglie Niskin della capacità di 30 litri alle seguenti profondità, (fig. 18):

COLONNA D'ACQUA	
3400 m	Acque profonde
BACINO L'ATALANTE	
3481,7m	Interfaccia
3490m	Brina

L'acqua campionata ad ogni profondità è stata filtrata in triplo su filtri Millipore da 0,22 $\mu$ -47mm fino ad otturazione per un massino di 20 litri. I filtri sono stati trattati diversamente:

- 1) un filtro è stato congelato TQ in ghiaccio secco (-70°C);
- 2) un filtro è stato trattato con buffer di lisi [QRL1 (10 $\mu$ l  $\beta$ -ME/1ml QRL1)+ lisozima (1mg/ml TE buffer)] e utilizzato in loco per l'estrazione degli acidi nucleici



con il Mini Kit Qiagen RNA/DNA, secondo protocollo suggerito dal produttore. Gli acidi nucleici estratti sono stati poi conservati in ghiaccio secco (-70°C);

3) un filtro è stato incubato overnight a 4°C con RNA later e poi trasferito in ghiaccio secco (-70°C).

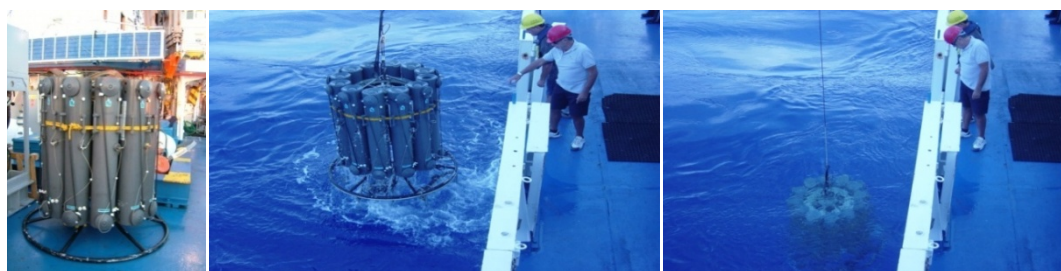


Fig. 18 – Fasi di campionamento

I campioni, sono stati poi spediti all'Istituto di Genomica Ambientale diretto dal Prof. Jizhong Zhou presso lo Stephenson Research Center dell'Università dell'Oklahoma, dove sono stati opportunamente trattati per l'applicazione della tecnica microarray.

### **1.1.3 Estrazione degli acidi nucleici**

L'estrazione del DNA genomico dai filtri è stata eseguita secondo il seguente protocollo (Zhou et al., 1996):

- 1) I filtri, non trattati, sono stati collocati all'interno di Falcon da 50ml e mescolati per diversi minuti con 5ml di buffer di estrazione ( $\text{NaH}_2\text{HPO}_4$  1M;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1M; EDTA 0.5M [pH8.0]; Tris-HCl 1M; NaCl 5M) per eliminare la biomassa;
- 2) Quindi il liquido è stato trasferito in Falcon pulite ed il lavaggio è stato ripetuto per tre volte;
- 3) E' stato misurato il pH mediante delle cartine tornasole e se troppo basso è stato portato a ~ 8.0 mediante l'aggiunta di NaOH;
- 4) Successivamente è stato sottoposto a centrifugazione alla velocità di 5000xg per 20 minuti. E' stata utilizzata una centrifuga Sorvall RC5C;
- 5) Il surnatante è stato trasferito in una Falcon pulita ed il pellet è stato risospeso in 1ml di buffer;

- 6) A questo punto il pellet è stato posto in un mortaio sterile dove sono stati aggiunti 2gr di sabbia, anch'essa sterile, ed è stato aggiunto dell'azoto liquido per congelare il campione che è stato macinato con un pestello fino a completo scioglimento. Questo ciclo di congelamento/scongelo è stato ripetuto per tre volte, quindi il campione è stato unito al surnatante precedentemente raccolto e congelato overnight a -80°C;
- 7) Dopo l'incubazione al campione sciolto sono stati aggiunti 14.99ml di buffer e 1.51ml di CTAB 10% e 61µl di proteinase K (10mg/ml);
- 8) Quindi è seguita un'incubazione per 30min a 37°C;
- 9) Successivamente sono stati aggiunti 1.83ml di SDS 20% alla quale è seguita un'incubazione di 2 ore a 65°C mescolando ogni 15 minuti;
- 10) Quindi il campione è stato centrifugato a 3600xg di 20 min a 25°C;
- 11) Il surnatante è stato trasferito in una falcon pulita evitando che la patina superficiale formatasi durante la centrifugazione venisse trasferita insieme al surnatante;
- 12) Al pellet sono stati aggiunti 5.5ml di buffer, 0.55ml di CTAB 10% e 0.67ml di SDS 20% e tutto è stato mescolato e incubato a 65°C per 15 min;
- 13) E' seguita una centrifugazione di 10 min a 3600xg a 25°C ed il surnatante è stato a quello precedentemente raccolto;
- 14) A questo punto il campione è stato sottoposto ad un'estrazione con alcol isoamilico/cloroformio (1 parte di alcool isoamilico, 24 parti di cloroformio) e successivamente centrifugato a 5000xg per 20min;
- 15) Il surnatante è stato raccolto e l'estrazione ripetuta per tre volte;
- 16) Sono stati aggiunti 0.6vol di isopropanolo ed incubati a -80°C overnight per favorire la precipitazione del DNA;
- 17) Quindi il campione è stato riscaldato a 37°C e centrifugato a 16000xg per 20min a 25°C, il pellet è stato lavato con etanolo al 70% (freddo) e centrifugato a 16000xg per 5min;
- 18) Il pellet è stato asciugato sotto cappa e risospeso in 50µl di H<sub>2</sub>O sterile e conservato a 20°C.

### 1.1.4 Purificazione del DNA

La purificazione del DNA è una fase molto importante nella preparazione dei campioni all'ibridizzazione, è fondamentale, infatti, purificare l'amplificato dalla presenza di impurità che potrebbero interferire con l'ibridizzazione o creare fluorescenza in background.

La concentrazione e la qualità del DNA sono state stimate misurando l'assorbanza a 260 e 280nm con lo spettrofotometro Nanodrop ND100 (NanoDrop Technology, Rockland, DE) e con una corsa elettroforetica in gel di agarosio (concentrazione 0.9%), (fig. 19).

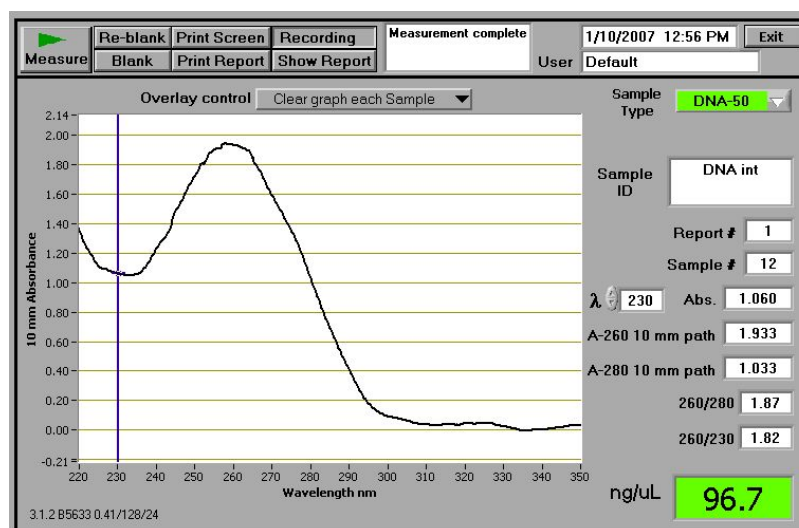


Fig. 5.3 – Lettura dell'assorbanza al Nanodrop.

I campioni che presentavano un rapporto  $260/280 < 1.8$  ed un rapporto  $260/230 < 1.7$  sono stati purificati e precipitati.

La purificazione è stata eseguita utilizzando il kit Wizard® DNA Clean-Up System (Promega) secondo il protocollo suggerito dal produttore.

La successiva precipitazione dei sali è stata effettuata secondo il seguente protocollo:

- 1) Ai campioni sono stati aggiunti 2.5 vol di etanolo al 95% e 1:10 volumi di NaOAc 3M, dopo di che sono stato incubati a temperatura ambiente per 2-3 ore,

- 2) E' seguita una centrifugazione a 14000xg per 30min. Il surnatante è stato eliminato ed il pellet è stato lavato con etanolo al 70% (freddo) a cui è seguita un'altra centrifugazione per 15 min a 14000xg;
- 3) Dopo aver eliminato il surnatante il pellet è stato asciugato per circa 30 minuti sotto cappa;
- 4) I campioni sono stati risospesi in acqua distillata sterile, priva di nucleasi.

Infine la qualità del DNA è stata controllata nuovamente al nanoDrop e successivamente conservato a -20°C.

### **1.1.5 Amplificazione del DNA**

L'intero genoma è stato amplificato, in triplo, con il Templiphi 500 amplification kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Sono state amplificate uguali quantità di DNA per ogni campione (50ng), il DNA è stato risospeso con 10µl di buffer contenente random hexamers ed incubato a temperatura ambiente per 10 minuti.

Dopodiché è stato unito alla miscela di reazione (0.6µl enzima; 1.25µl SSB[concentrazione finale 260ng/µl]; 1µl spermidina) ed incubato per 3 ore a 30°C e 15min a 65°C per inattivare l'enzima e raffreddato a 4°C.

Il prodotto amplificato è stato visualizzato su gel di agarosio all'1%, (Wu et al 2006).

### **1.1.6 Labeling**

Il campione amplificato è stato mescolato con 1µg di random primer, denaturato a 99.9°C per 5 minuti e immediatamente raffreddato in ghiaccio. La miscela contenente il DNA denaturato, è stata mescolata con 2.5 µL di dNTP [dATP, dTTP, dGTP 5 mM ognuno, e dCTP 2.5 mM (New England Biolabs, Beverly, MA, USA)], 1 µL di Cy5-dUTP (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA), e 40 U/µl di frammento Klenow (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in un volume totale di 50 µL e incubata a 37°C per 3 ore seguita da 5 minuti a 95°C. Il DNA target è stato, quindi, purificato con il kit della Qiagen QIAquick<sup>TM</sup> PCR purification column.

Poiché il mio studio non si è basato su un confronto fra un campione ed un controllo, ma sulla valutazione della presenza/assenza dell'attività genica, è stato utilizzato un solo fluoro cromo, il Cy5.

L'incorporazione della Cy5 è stata valutata con il Nanodrop (fig. 20) e successivamente il campione è stato concentrato in uno SpeedVac® (Thermo Savant, Holbrook, NY, USA) a 45°C per 45 minuti e risospeso in 50µl di acqua distillata ultrapura, (Tiquia et al., 2004).

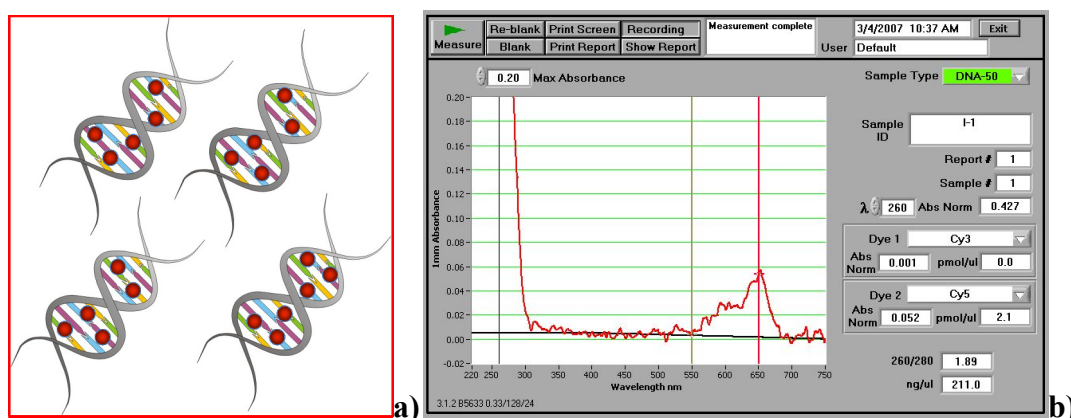


Fig. 20 – a) Schema incorporazione Cy5; b) Spettro incorporazione Cy5

### 1.1.7 Ibridizzazione

Per minimizzare gli errori dovuti ad amplificazioni casuali o ad un labeling poco efficiente, i campioni in triplo sono stati uniti e ri aliquitati prima dell'ibridizzazione, quindi sono stati risospesi in una miscela di ibridizzazione contenente il 50% di formammide, SSC 20x, SDS 10%, herring sperm DNA (10mg/ml-Promega, Madison, WI), DTT 0.1M ed acqua distillata, per un volume totale di 120µl. Ogni campione è stato poi incubato a 98°C per 3 minuti e mantenuto alla temperatura di 60°C fino al momento di essere caricato.

L'esperimento di ibridizzazione è stato condotto overnight a 50%, a questa temperatura si possono ottenere delle ibridizzazioni specifiche con sequenze target aventi il 90% di similarità, inoltre, con queste condizioni restrittive viene diminuita la possibilità di ibridizzazioni aspecifiche, (Zhou et al, 2006).

Le fasi di **pre-ibridizzazione**, **ibridizzazione** e lavaggio **post-ibridizzazione** sono state eseguite mediante l'utilizzo di una stazione di ibridizzazione automatizzata (TECAN rading AG, Switzerland), (fig. 21).

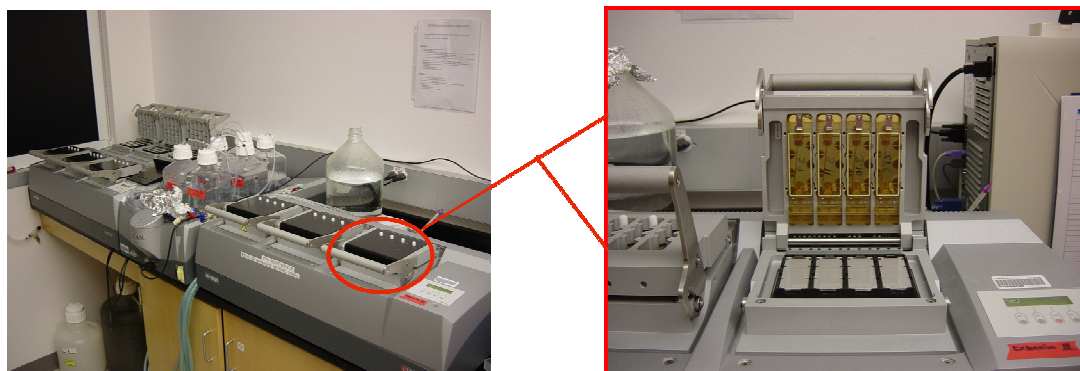


Fig. 21 – Stazione di ibridizzazione e particolare della camera di ibridizzazione.

#### **1.1.8 Scansione e normalizzazione dei dati.**

I chip microarray sono stati scansionati con uno ScanArray express della Perkin-Elmer (Wellesley, MA).

E' stata eseguita una scansione con una risoluzione di 10 $\mu$ m (le migliori condizioni di risoluzione dovrebbero essere mantenute in un range di 1/10 del diametro dello spot), e la potenza del laser è stata mantenuta al 95%. L'immagine ottenuta è stata salvata come file TIFF a 16-bit ed analizzata con il software ImaGene 6.0 (Biodiscovery, Inc., Los Angeles, CA), (fig. 22).

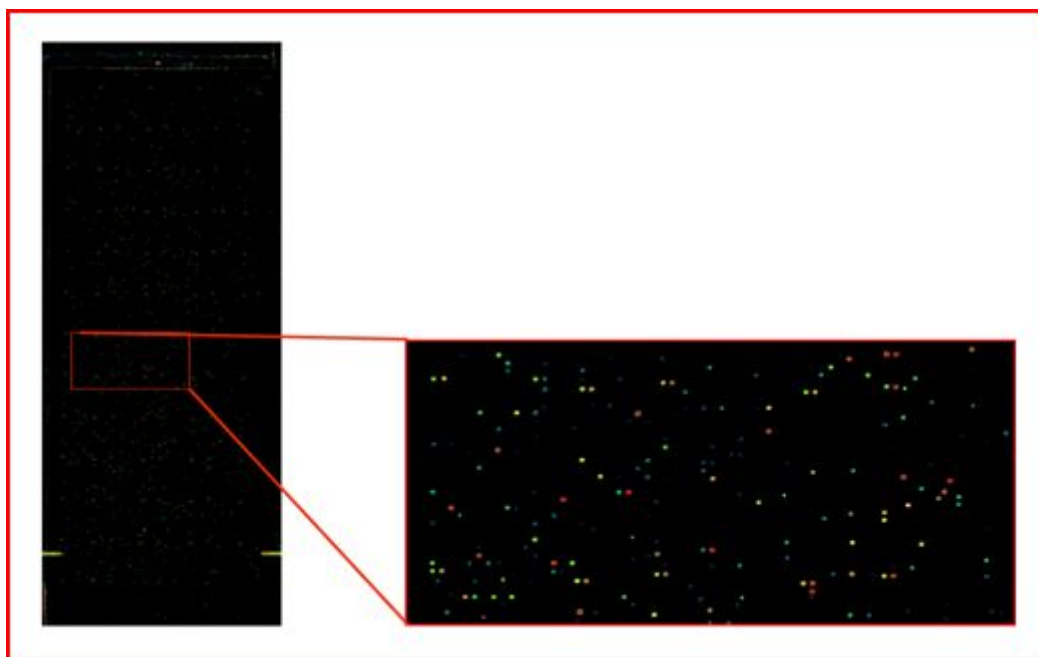


Fig. 22 – Immagine ottenuta dopo la scansione

A causa delle piccole dimensioni, delle differenze nella fase di stampa sul vetrino e di una non uniformità di ibridizzazione, gli spot array presentano un grado elevato di “rumore” che influenza negativamente la fase di interpretazione dei dati, (He and Zhou, 2008). Per questo motivo i dati ottenuti sono stati sottoposti ad ulteriori analisi. La normalizzazione è stata eseguita con un programma Perl che include i seguenti step:

- 1) Gli spot con intensità troppo bassa sono stati eliminati;
- 2) L'intensità di ogni spot è stata normalizzata secondo la media del segnale;
- 3) Gli spot con una bassa intensità del segnale sono stati rimossi secondo il rapporto segnale rumore (SNR) (Wu et al., 2006a).

Gli spot con un  $SNR < 3$  sono stati eliminati:

$$SNR = \frac{(Intensità\ media\ del\ segnale - background)}{ds\ background}$$

4) Sono stati rimossi gli outlier, cioè se una delle repliche aveva una differenza segnale-media maggiore di tre volte la deviazione standard, questo spot veniva rimosso, (He et al., 2007).



## 1.2 RISULTATI

### 1.2.1 - Ibridizzazione *geoChip*

I risultati ottenuti dagli esperimenti di ibridizzazione sono mostrati nei grafici 1 e 2.

Il grafico 1 mostra l'espressione percentuale delle classi metaboliche presenti nell'FGAII riferite al numero totale degli spot che sono risultati positivi. Fatta eccezione per i geni relativi alla metanogenesi ed alla fissazione del carbonio tutte le classi sono rappresentate nei tre i campioni.

Le acque profonde al di sopra del bacino (campione 3400m) hanno mostrato una maggiore espressione dei geni relativi alla degradazione dei composti organici (31%) e della resistenza ai metalli (19,67%), le classi relative alla degradazione del carbonio, dell'azoto e dello zolfo mostrano un'attività inferiore al 15%, manca totalmente l'espressione dei geni relativi alla fissazione del carbonio ed alla metanogenesi.

Il campione di Interfaccia mostra valori più elevati per quanto riguarda il ciclo dello zolfo (49,74%), infatti, circa il 50% dell'attività di questo campione riguarda la riduzione del solfato, il restante 50% è distribuito in maniera più o meno equa nelle restanti classi metaboliche.

Nel campione di brina sono espressi i geni relativi a tutte le vie metaboliche, la più abbondante delle quali è quella della degradazione organica (48,16%), seguita dall'azoto (21,25%).

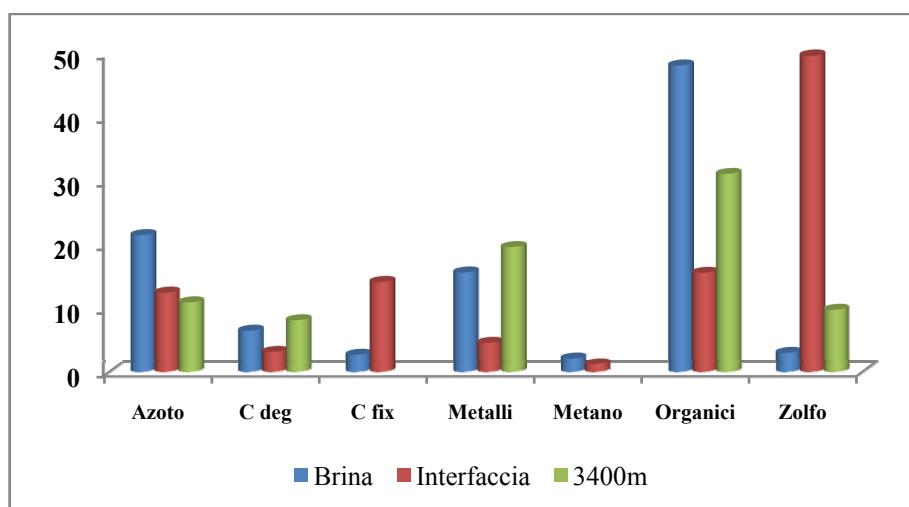


Grafico 1 – Espressione percentuale rappresentata per classi metaboliche.

In tabella sono mostrati i dati percentuali.

	3400M	INTERFACCIA	BRINA
<b>Azoto (N)</b>	11%	12,53%	21,55%
<b>Fissazione del carbonio (C fix)</b>	0	3,23%	6,55%
<b>Degradazione del carbonio (C deg)</b>	8,20%	14,21%	2,78%
<b>Resistenza ai metalli</b>	19,67%	4,65%	15,69%
<b>Metano</b>	0	1,25%	2,18%
<b>Degradazione dei composti organici</b>	31%	15,63%	48,16%
<b>Zolfo (S)</b>	9,84%	49,74%	3,08%

L'attenzione sull'espressione genica è stata focalizzata sui target riguardanti i cicli dell'azoto, dello zolfo e del carbonio, perciò sono stati rappresentati graficamente quei geni la cui espressione risultava essere più significativa nelle rispettive vie metaboliche, (grafico 2).

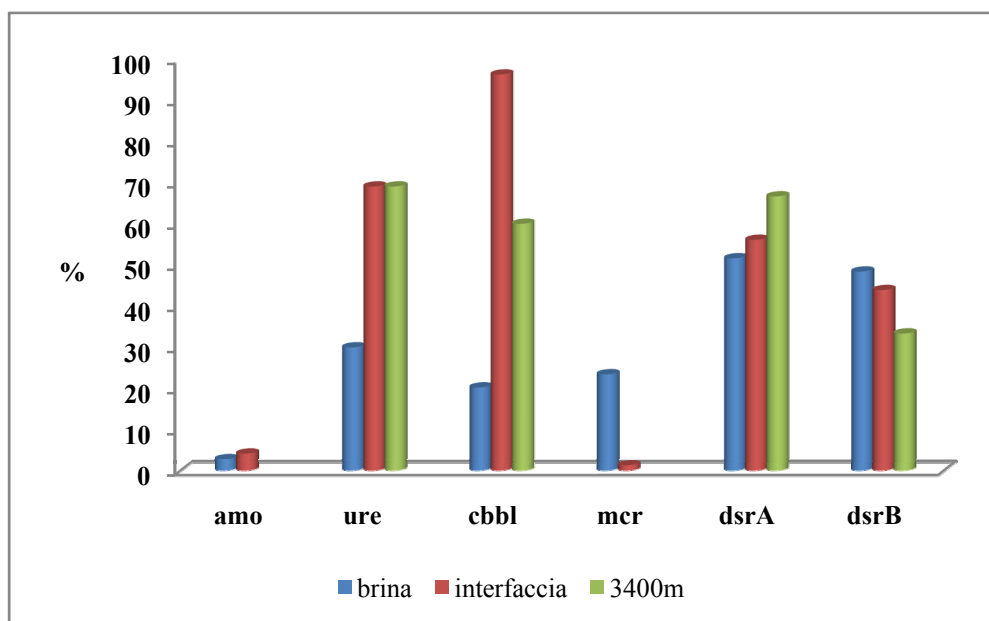


Grafico 2 – Rappresentazione percentuale dei geni più significativi.

Come si può notare dal grafico il gene *amo* è presente solo nei campioni di interfaccia e brina. La co-presenza del gene *ure*, che mostra importanti livelli di espressione, suggerisce che nel bacino ci sia una rilevante attività ammonio ossidativa.

Inoltre, essendo questo gene associato all'ossidazione del metano e considerando anche la presenza del gene *mcr* negli stessi campioni, si può ipotizzare che vi sia nel bacino un'intensa attività relativa all'ossidazione e genesi del metano.

La presenza dei geni *drs* in tutti e tre i campioni concorda con gli studi effettuati negli anni passati i quali hanno evidenziato un'attiva riduzione/ossidazione anaerobia dello zolfo e allo stesso tempo un'ossidazione microaerofila.

I livelli di espressione del gene *cbbl* mostrano che la fissazione del carbonio è un processo importante anche negli ambienti profondi.

La tabella mostra i valori percentuali dell'espressione dei geni target.

Gene	3400M	INTERFACCIA	BRINA
<b>amo</b>	11%	12,53%	21,55%
<b>ure</b>	8,20%	3,23%	6,55%
<b>cbbl</b>	20,2%	14,21%	2,78%
<b>mcr</b>	19,67%	4,65%	15,69%
<b>dsrA</b>	51,6	56,1	2,18%
<b>dsrB</b>	31%	15,63%	48,16%

### 1.2.2 Clustering gerarchico

Il clustering gerarchico è un metodo semplice per visualizzare i risultati utilizzando dei dendogrammi che oltre a formare gruppi mettono in relazione i singoli geni ed i siti di campionamento, costruendo una gerarchia che si ramifica fino ad arrivare al singolo elemento.

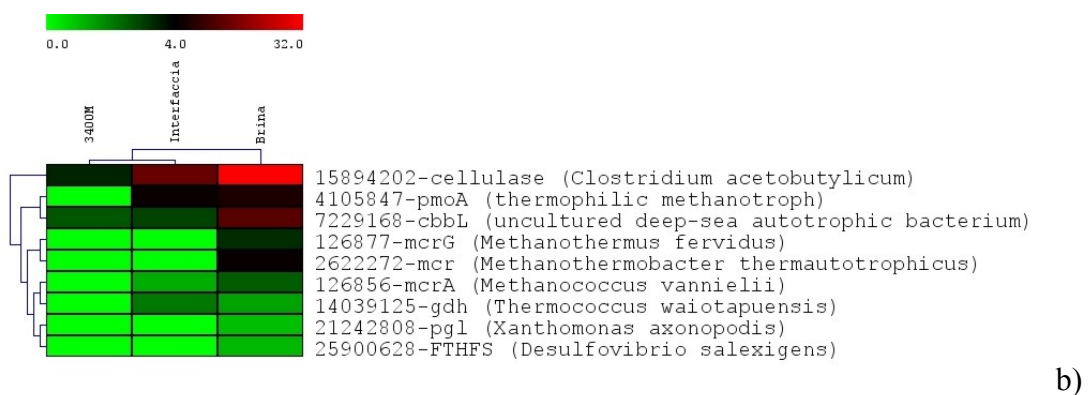
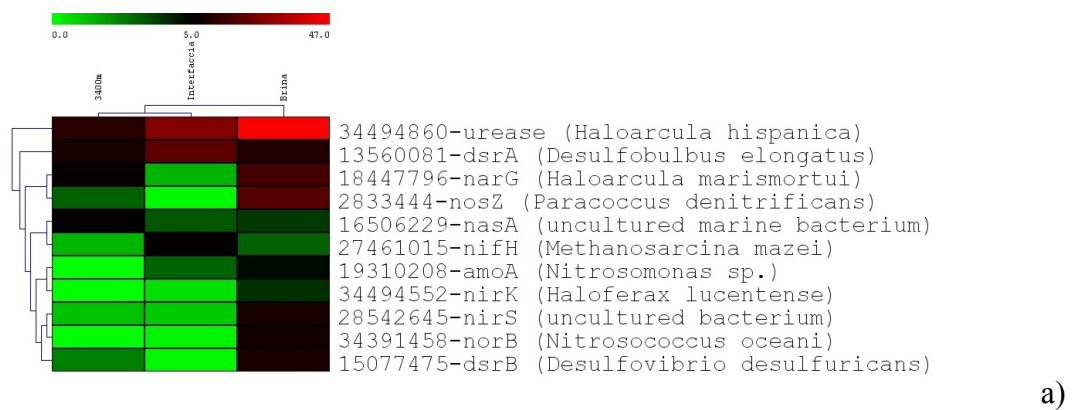
La tecnica del clustering applicata all'analisi dei dati microarray raggruppa i geni che mostrano un simile comportamento fra i differenti punti sperimentali

I dati grezzi vengono convertiti in rappresentazioni grafiche indicando ogni dato con un colore che lo descrive qualitativamente e quantitativamente. Generalmente i colori utilizzati vanno dal verde saturo (valore max negativo) al rosso negativo (valore max positivo), i geni il cui ratio è zero sono generalmente neri. In questo caso il valore di max negatività è rappresentato dal verde, mentre il nero indica un valore intermedio di espressione.

Gli algoritmi di cluster utilizzano la somiglianza tra vettori per comparare i pattern di espressione, quindi, la distanza tra due geni viene misurata comparando la distanza tra i rispettivi vettori. Ci sono diversi metodi per calcolare tale distanza, in questo caso è stato utilizzato il metodo della distanza Euclidea, la quale raggruppa i geni che hanno andamenti simili a livelli di espressione simili.

Dai grafici ottenuti si può avere un'idea immediata riguardo l'espressione genica quantitativa semplicemente dalla saturazione dei colori.

I grafici sono stati ottenuti utilizzando il programma MEV (Multiple Experiment Viewer, <http://www.tm4.org/mev.html>). Le differenze di espressione sono rappresentate rispettivamente dal verde (mancanza di ibridizzazione) e dal rosso (valore massimo), il diverso grado di saturazione dei due colori indica diversi pattern di ibridizzazione, (fig. 23).



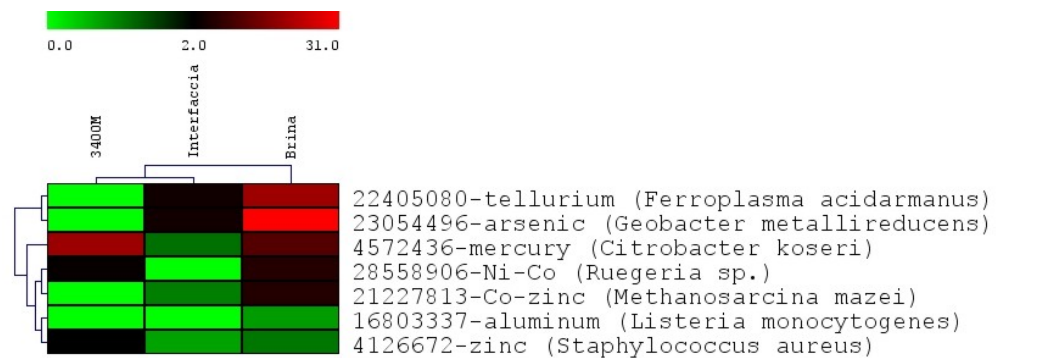
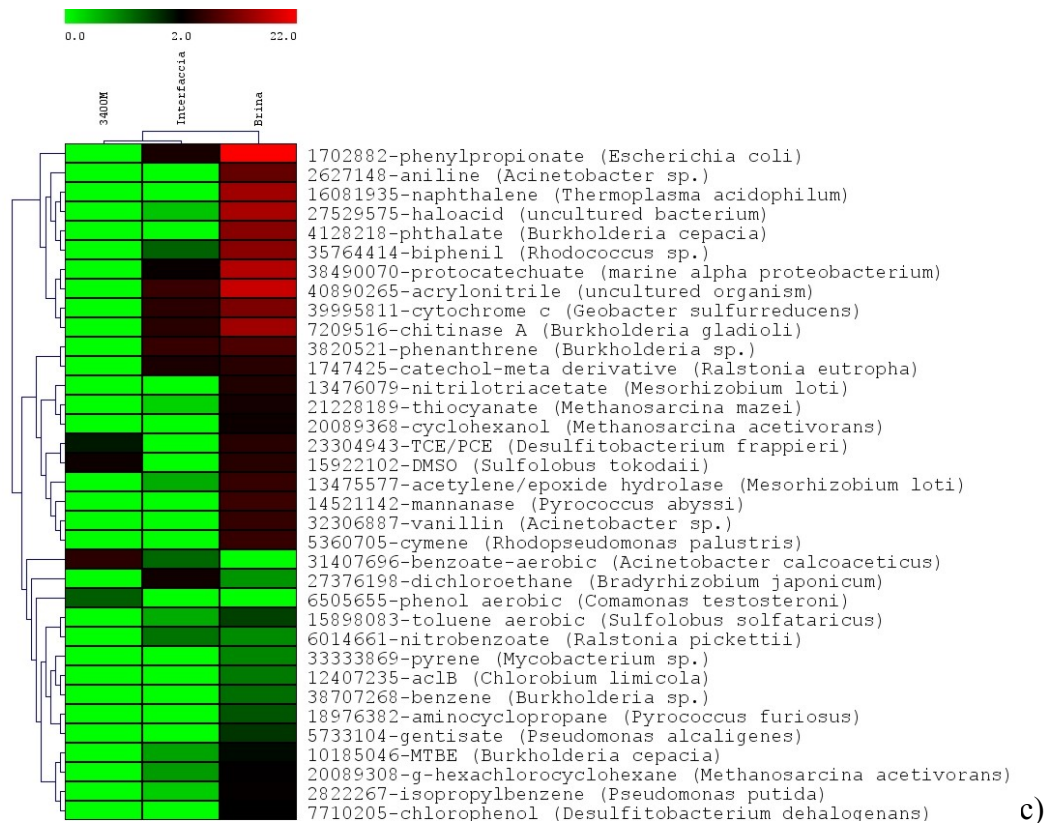


Fig 23 – Cluster gerarchico dei geni basato sui segnali di ibridizzazione. a) Azoto e Zolfo; b) Carbonio; c) composti organici; d) Metalli

## CAPITOLO 2 – SECONDA FASE

*“Valutazione dell’attività dei geni target nei campioni provenienti dal bacino anossico MEDEA”*

### 2.1 MATERIALI E METODI

#### 2.1.1 Campagna di campionamento e raccolta dei campioni

Il campionamento relativo alla seconda fase del lavoro è avvenuto nell’ambito della campagna oceanografica MEDBIO2 che ha avuto luogo sulla nave Urania dall’11 al 24 dicembre 2007, (fig. 24).

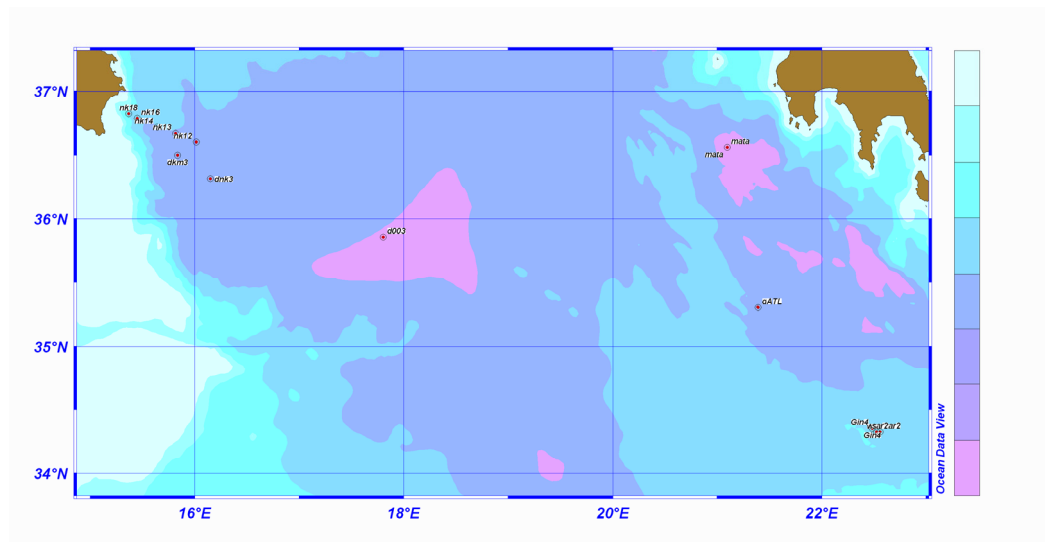


Fig. 24 – Mappa della Campagna Oceanografica MEDBIO2

La campagna oceanografica prevedeva una serie di campionamenti che sono stati eseguiti con una Rosette e equipaggiata di bottiglie Niskin del volume di 10L ciascuna. Il campionamento è avvenuto secondo il seguente programma:

STAZIONE	Latitudine NORD	Longitudine EST	PROFONDITA’	TIPOLOGIA CAMPIONE	DATA
NK18	29°49,09	15°22,04	2320	Colonna d’acqua	12-12-07
NK16	36°46,92	15°26,95	2250	Colonna d’acqua	12-12-07
NK14	36°43,03	15°38,48	2893	Colonna d’acqua	12-12-07
NK13	36°40,005	15°48,980	3266,6	Colonna d’acqua	13-12-07

<b>NK12</b>	36°36,087	16°00,075	3212	Colonna d'acqua	13-12-07
<b>KM3</b>	36°29,99	15°50,08	3373	Colonna d'acqua	13-12-07
<b>KM3b</b>	36°30,12	15°50,24	3360/440	Colonna d'acqua	13-12-07
<b>KM3c</b>	36°30,11	15°50,50	3361,9	Colonna d'acqua	13-12-07
<b>NK3</b>	36°19,035	16°08,950	3330	Colonna d'acqua	13-12-07
<b>Matapan</b>	36°33,58	21°05,90	5070	Colonna d'acqua	15-12-07
<b>Matapan2</b>	36°33,58	21°05,75	5069/1750	Colonna d'acqua	15-12-07
<b>Matapan (boxcorer)</b>	36°33,61	21°05,81	5070	Sedimenti	16-12-07
<b>Medea (Sara) *</b>	34°21,34	22°29,17	3054	Brina	17-12-07
<b>Medea (Sara2) *</b>	34°19,62	22°33,68	2922	Interfaccia	17-12-07
<b>Medea (wcast) *</b>	34°19,66	22°31,56	2850	Acqua sopra Interfaccia	17-12-07
<b>Medea (wcast2)</b>	34°19,708	22°31,55	3060/500	Colonna d'acqua sopra il bacino	17-12-07
<b>Medea (Gina) *</b>	34°21,34	22°19,156	3039	Brina	17-12-07
<b>Medea (Gina2)</b>	34°21,34	22°29,152	3040	Brina	18-12-07
<b>Medea (Gina3)</b>	34°21,34	22°29,159	3040	Brina	18-12-07
<b>Medea (Gina4)</b>	34°21,482	22°29,159	3039	Brina	18-12-07
<b>L'Atalante (Chicca)</b>	35°18,32	21°23,37	3435	Interfaccia	19-12-07
<b>L'Atalante (Atl)</b>	35°18,28	21°23,42	3430	Brina	19-12-07
<b>003</b>	35°51,45	17°48,18	4075	Sedimenti	20-12-07

Le stazioni indicate con l'asterisco rosso sono quelle che hanno interessato il mio campionamento. In particolare per quanto riguarda la stazione Sara2 il campionamento della zona di interfaccia è avvenuto lungo un range di profondità di 200m, compreso fra 2885 e 3086m. Le bottiglie Niskin sono state chiuse a precise profondità stabilite seguendo il profilo CTD (Conduttività, Temperatura, salinità), (fig. 25).

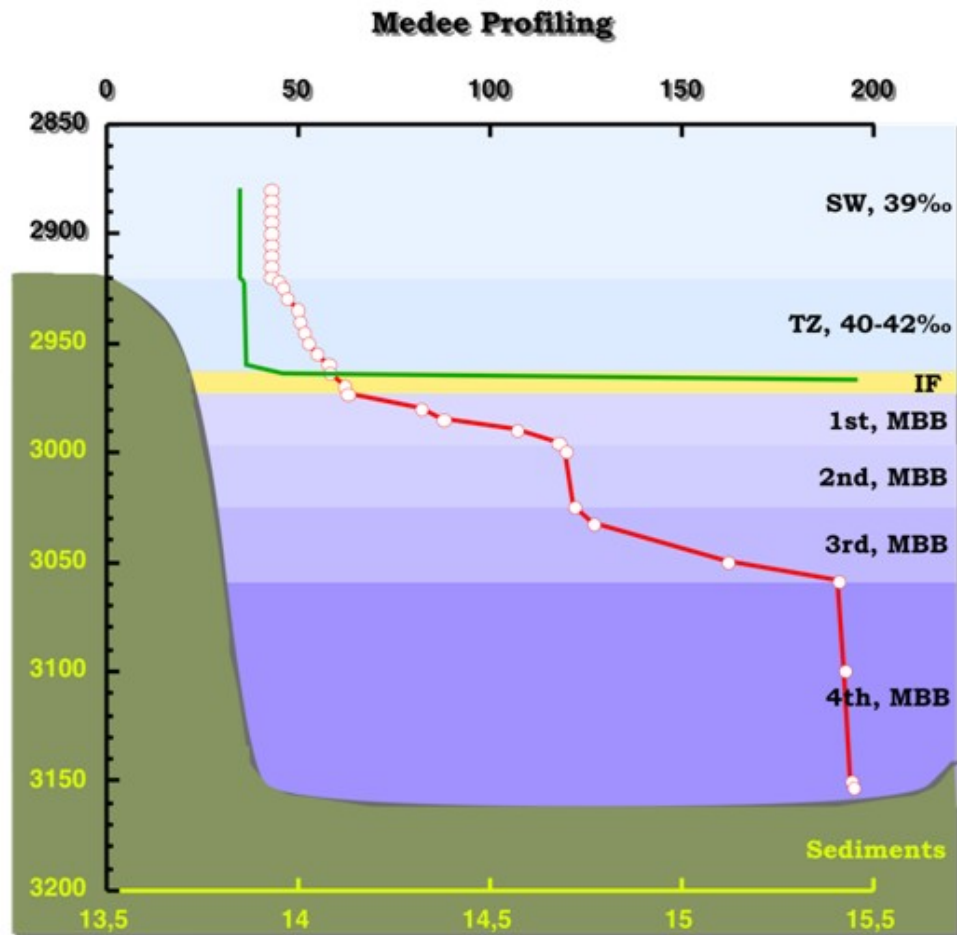


Fig. 25 – Profilo CTD della salinità della zona di transizione fra acque profonde, Interfaccia e Brina

La salinità è stata misurata la salinità mediante un refrattometro (ATAGO U.S.A., Inc.) prelevando dei piccoli campioni dalla parte superiore ed inferiore della bottiglia Niskin, potendo così distinguere con precisione quali bottiglie contenevano campioni di Interfaccia da quelle che, invece, contenevano campioni di Brina, (fig. 26).





Fig. 26 – Stima della salinità mediante refrattometro.

Per le successive analisi sono stati scelti campioni di salinità variabile, in particolare le bottiglie numero 20 (contenente Interfaccia), e le numero 21 e 22 che, invece, contenevano la zona di transizione fra colonna d'acqua ed Interfaccia. I campioni presentavano i seguenti valori di salinità:

PROFONDITA' (m)	BOTTIGLIA NISKIN N°		SALINITA' gr/100ml
2922	20 Interfaccia Inferiore	Up	10,2
		Down	14,8
2922	21 Interfaccia Superiore	Up	5
		Down	8,1
2922	22 Interfaccia Superiore	Up	4,6
		Down	4,8

Tutti i campioni prelevati sono stati filtrati su filtri Sterivex™ (Millipore®) da 0,22μ, fino a completa otturazione del filtro stesso, trattati quindi con buffer di lisi [QRL1 (10μl β-ME/1ml QRL1)+ lisozima (1mg/ml TE buffer)].

Sono stati filtrati i seguenti volumi:

BACINO	STAZIONE	VOLUME FILTRATO	TIPO DI CAMPIONE
Medea	Sara	5L	Brina
Medea	Gina	9L	Brina
Medea	Sara2	5L+5L	Interfaccia Bottiglia20
Medea	Sara2	10L	Interfaccia Bottiglia 21
Medea	Sara2	10L	Interfaccia Bottiglia 22
Medea	Wcast	24L	Acqua

La successiva estrazione degli acidi nucleici è avvenuta utilizzando il kit Qiagen DNA/RNA MiniMinikit secondo protocollo suggerito dal produttore.

Quindi la concentrazione e la qualità del DNA e dell'RNA sono state stimate misurando l'assorbanza a 260 e 280nm con lo spettrofotometro Nanodrop ND100 (NanoDrop Technology, Rockland, DE) e mediante elettroforesi in gel di agarosio (concentrazione 0,9%).

Poiché avevano valori di salinità molto vicini, dopo l'estrazione degli acidi nucleici i campioni di interfaccia provenienti dalla bottiglia n° 21 e n° 22 sono stati uniti.

In considerazione della buona qualità degli acidi nucleici, secondo i parametri già esposti nel paragrafo 1.1.4, non sono state necessarie successive procedure di purificazione e precipitazione per il DNA, l'RNA invece è stato purificato in fase di trascrizione inversa.

In tabella sono rappresentate le concentrazioni degli acidi nucleici ed i rapporti 260/280 e 260/230.

CAMPIONE	Acido nuclico	ng/μl	260/280	260/230
BRINA (Sara)	DNA	34,24	1,82	1,7
BRINA (Gina)	DNA	23,49	1,81	1,73
INT (20)	DNA	13,27	1,8	1,76
INT (21)	DNA	7,645	1,86	1,75
INT (22)	DNA	43,87	1,82	1,7
WCAST	DNA	25,97	1,9	1,70
BRINA (Sara)	RNA	22,50	1,76	1,69
BRINA (Gina)	RNA	7,96	1,77	1,76
INT (20)	RNA	43,10	1,86	1,73
INT (21)	RNA	23,32	1,78	1,75
INT (22)	RNA	5,52	1,82	1,8
WCAST	RNA	20,62	1,85	1,87

### **2.1.2 Trattamento e trascrizione inversa dell'RNA**

15 μl dell'RNA estratto sono stati trattati con il TURBO DNA-free™ Kit (Applied Biosistem) per eliminare la contaminazione da parte del DNA secondo protocollo suggerito dal produttore.

La trascrizione inversa in cDNA è stata eseguita con il kit SuperScript II Reverse Transcriptase dell'Invitrogen utilizzando i random primers (50-250 ng) ed una

quantità di RNA uguale per tutti i campioni (25ng) in modo da uniformare le condizioni sperimentali.

### 2.1.3 Amplificazione dei campioni di cDNA e DNA

I campioni wcast, INT20, INT21-22 e Brina, sono stati amplificati utilizzando le seguenti coppie di primers specifici per il 16S rRNA e per i geni scelti come target:

GENE	SEQUENZA PRIMER	RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICO
<b>cbbL F</b>	5'-GAC TTC ACC AAA GAC GAC GA-3'	Elsaied et. al, 2007
<b>cbbL R</b>	5'-TCG AAC TTG ATT TCT TTC CA-3'	Elsaied et. al, 2007
<b>dsrAB (IF1)</b>	5'-CAG GAY GAR CTK CAC CG-3'	Hallsworth et. al, 2007
<b>dsrAB (IR1)</b>	5'-CCC TGG GTR TGR AYR AT-3'	Hallsworth et. al, 2007
<b>aprA-1-F</b>	5'-TGG CAG ATC ATG ATY MAY GG-3'	Meyer et. Al, 2007
<b>aprA-5-RV</b>	5'-GCG CCA ACY GGR CCR TA-3'	Meyer et. Al, 2007
<b>aprA-3-FW</b>	5'-TGG CAG ATM ATG ATY MAC GG-3'	Meyer et. Al, 2007
<b>APS-RV</b>	5'-GGG CCG TAA CCG TCC TTG AA-3'	Meyer et. Al, 2007
<b>mcrA-F52</b>	5'-GCT GCA TAC ACC AAC AAY AT-3'	Hallsworth et. al, 2007
<b>mcrA-R420</b>	5'-CCA CAC TGG TCY TGC ARG TC-3'	Hallsworth et. al, 2007
<b>16S rRNA-(530F)</b>	5'-GTG CCA GCM GCC GCG G-3	
<b>16S rRNA-(1492R)</b>	5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT-3'	

L'amplificazione è stata eseguita in un termociclatore EuroClone Gradient One della ditta Celbio secondo i seguenti step: 95°C 3 min, 35 cicli a: 95°C per 1min, 50°C per 1min, l'estensione a 72°C per 2min, e l'estensione finale a 72°C per 10min.

Il prodotto PCR è stato verificato e caricato per intero su un gel d'agarosio allo 0,9%, le specifiche bande sono state tagliate e purificate con il kitQIAquick gel extraction (Qiagen).

### 2.1.4 OneStep RT-PCR

I campioni che non hanno amplificato sono stati sottoposti a OneStep RT-PCR, questa tecnica permette di effettuare contemporaneamente la trascrizione inversa e l'amplificazione dell'RNA di partenza. La procedura è stata eseguita utilizzando le

stesse coppie di primers con il QIAGEN<sup>®</sup> OneStep RT-PCR Kit secondo protocollo suggerito dal produttore.

## **2.2 CLONAGGIO E SEQUENZIAMENTO**

### **2.2.1 Ligazione**

Il prodotto PCR è stato ligato nel plasmide pGEM (pGEM Easy Vectors System, Promega). La miscela contenete 3,8µl di prodotto purificato, 5µl di 2x Rapid Ligation Buffer T4 DNA Ligase e 0.2µl di pGEM<sup>®</sup> Easy Vector è stata incubata a 65°C per 10min quindi è stato aggiunto 1µl di T4 DNA Ligase (3 unità/µl). Il tutto è stato incubato overnight a 4°C.

Il prodotto ligato è stato poi purificato aggiungendo 20µl di H<sub>2</sub>O sterile ultrapura, 300µl di butanolo e centrifugato a 14000rpm per 20 minuti. Il surnatante è stato eliminato ed il pellet è stato lavato con 200µl di etanolo al 70% e ricentrifugato a 14000rpm per 20min. Il surnatante è stato eliminato ed il pellet è stato portato a secco al concentrator 5301 (Eppendorf).

### **2.2.2 Trasformazione e sequenziamento**

Il prodotto di ligazione è stato trasformato per elettroporazione in 10µl di cellule competenti, (*Escherichia coli* DH10B Electro-Competent Cells - Invitrogen) e incubato a 37°C per un'ora. Quindi, le cellule sono state piastrate su terreno solido LB contenente 500µl/l di ampicillina, 100µl/l di IPTG e 200µl/l X-Gal e incubate in termostato a 37°C overnight.

Il terreno di coltura utilizzato permette la selezione delle cellule trasformate che contengono solo il plasmide (colonie blu) da quelle che contengono il plasmide con l'inserto ligato (colonie bianche).

Il principio di selezione si basa sul fatto che il sottoprodotto della metabolizzazione del galattosio (XGal) conferisce alle colonie una colorazione blu, mentre il pGEM rende le cellule trasformate resistenti all'antibiotico ampicillina. L'inserzione del frammento ligato all'interno del plasmide interrompe il gene XGal inattivandolo, si ottengono così delle colonie bianche.

Per la costruzione delle librerie di cloni basate sul 16S rRNA sono state selezionati 100 cloni per ogni campione, mentre per le librerie dei geni funzionali sono stati selezionati 20 cloni per ogni campione.

La selezione degli inserti è stata eseguita tramite PCR, senza estrazione del plasmide, utilizzando la seguente coppia di primer:

M13F [5'-GACGTTGTAAAACGACGGCCA-3'];

M13R [5'-CACAGGAAACAGCTATGACCA-3'].

La reazione di PCR è stata eseguita come descritto nel paragrafo 2.1.3

I cloni che hanno amplificato sono stati sottoposti a reazione di bigdye (ABI PRISM BigDye<sup>®</sup> Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit -PE Applied Biosystems) e purificati con sephatex (2gr/80ml) prima di essere sequenziati.

### ***2.2.3 Analisi filogenetiche***

Le sequenze sono state controllate utilizzando il programma CHECK\_CHIMERA (Maidak et al., 1999) per determinare l'eventuale presenza di ibridi e comparate con il database nucleotidico online GenBank (Altschul et al., 1997) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Le sequenze dei geni funzionali sono state tradotte in sequenze amminoacidiche e comparate con il database proteico online Protein BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Il successivo allineamento delle sequenze, sia preteiche che nucleotidiche, è stato eseguito mediante il software MacVector (Accelrys, San Diego, CA) v. 7.2.2 (Rajagopal, 2000), le distanze evoluzionarie sono state calcolate con il programma DNADIST (PHILIP) incluso nel MacVector, utilizzando l'algoritmo Jukes-Cantor.

Le sequenze che avevano il 97% di similarità sono state raggruppate come filotipi, quelle invece con una similarità  $\geq 98\%$  sono state considerate uguali e raggruppate come specie.

## 2.3 RISULTATI

### 2.3.1 *Analisi filogenetiche del 16s rRNA*

Gli alberi filogenetici relativi al gene 16S rRNA essendo stati costruiti sulla base di sequenze provenienti da cDNA evidenziano la presenza di comunità microbiche metabolicamente attive.

Il campione di Brina mostra una buona percentuale di cloni appartenenti al gruppo KB1, MSBL1 (Mediterranean Sea Brine Lakes group 1- Euryarchaeota) e dei delta, dove invece le acque profonde al disopra del bacino (campione 3400m) mostrano una differente struttura della comunità microbica con una dominanza da parte del gruppo dei Gammaproteobatteri.

Gli alberi filogenetici costruiti sui campioni di Interfaccia 20 e 21 mostrano una maggiore diversità rispetto ai campioni di Brina e 3400m.

Il campione Int21, proveniente dalla zona di interfaccia superiore, risulta essere il più diversificato e maggiormente rappresentato dal gruppo dei Deltaproteobatteri, manca totalmente il gruppo dei MSBL1, mentre è presente il Phylum dei Crenarchaeota.

Il campione Int20, invece, risulta dominato quasi unicamente da una popolazione microbica caratteristica dei DHABs. Risultano abbondanti i cloni che sono stati affiliati ad uncultured associati a comunità metano ossidanti, ciò concorderebbe con la provenienza del campione I20 dalla zona di interfaccia inferiore, che si trova a stretto contatto con la Brina dove l'attività metanogena è presente.

### 2.3.2 *Analisi filogenetiche dei geni funzionali*

L'amplificazione dei campioni con i primers dei geni funzionali ha prodotto i seguenti risultati:

Gene		WCAST	Interfaccia 20	Interfaccia 21	Brina
<i>dsrAB</i>	DNA	-	+	+	-
<i>APS</i>	DNA	+	-	+	+
<i>apr</i>	cDNA		+	+	+
<i>mcr</i>	cDNA	-	-	-	+
<i>cbbL</i>	cDNA	-	+	+	+
<i>16S rRNA</i>	cDNA	+	+	+	+

Le librerie di cloni dei geni *mcr*, *cbbL* e *apr* sono state costruite utilizzando l'RNA retro trascritto (cDNA), mentre quelle relative ai geni *dsrAB* e *APS* utilizzando il DNA.

I risultati dell'amplificazione concordano con i dati array, (par. 1.2.1, grafico 2). Gli alberi filogenetici dei geni funzionali sono stati costruiti utilizzando le traduzioni delle sequenze nucleotidiche ottenute nella fase di sequenziamento.

Il gene *mcr* ha amplificato solo nel campione di Brina, e provenendo da un campione di cDNA presuppone la presenza di una popolazione metabolicamente attiva. Le affiliazioni filogenetiche non hanno evidenziato la presenza di cloni ascrivibili ad organismi conosciuti ma piuttosto ad uncultured Archaeon.

Anche per il gene *cbbL* si può presupporre la presenza di una popolazione metabolicamente attiva essendo stato anch'esso amplificato da campioni di cDNA, anche qui non si riscontrano affiliazioni ad organismi conosciuti eccetto che per alcuni cloni affiliati all'endosimbionte del Gamma Proteobatterio *Bathymodiolus azoricus*.

Le sequenze dei geni *apr*, *APS* e *dsrAB* sono state raggruppate insieme per dare una visione complessiva della popolazione solfato-riduttrice. I cloni provenienti dai campioni di acqua, interfaccia e brina avevano una percentuale di similarità con le sequenze di NCBI Protein BLAST compresa fra l'89 ed il 99%.

I cloni non presentano delle affiliazioni a livello di specie, ma sono chiaramente associati a solfato-riduttori appartenenti al gruppo dei Clostridi (*Desulfotomaculum thermoacetoxidans*- ABR92588), degli Euryarchaeota (*Archaeoglobus veneficus*- AAL57399), dei Beta Proteobatteri (*Thiobacillus denitrificans*- ABV80031), dei Delta Proteobacteria (*Desulfovibrio fructosovorans*- AAL57376), dei Gamma Proteobatteri (*Candidatus Vesicomysocius*- YP\_001218952) e di uncultured.

Considerando la buona qualità dei cromatogrammi di sequenza, che presentavano dei picchi puliti e di ottima intensità, la bassa percentuale di similarità delle sequenze potrebbe suggerire la presenza di gruppi nuovi di solfato riduttori.

Le analisi filogenetiche relative ai geni funzionali sono state eseguite selezionando 20 cloni per campione, laddove la diversità microbica risultava elevata il numero dei cloni selezionati è stato aumentato.

Nelle figure che seguono sono rappresentati gli alberi filogenetici.

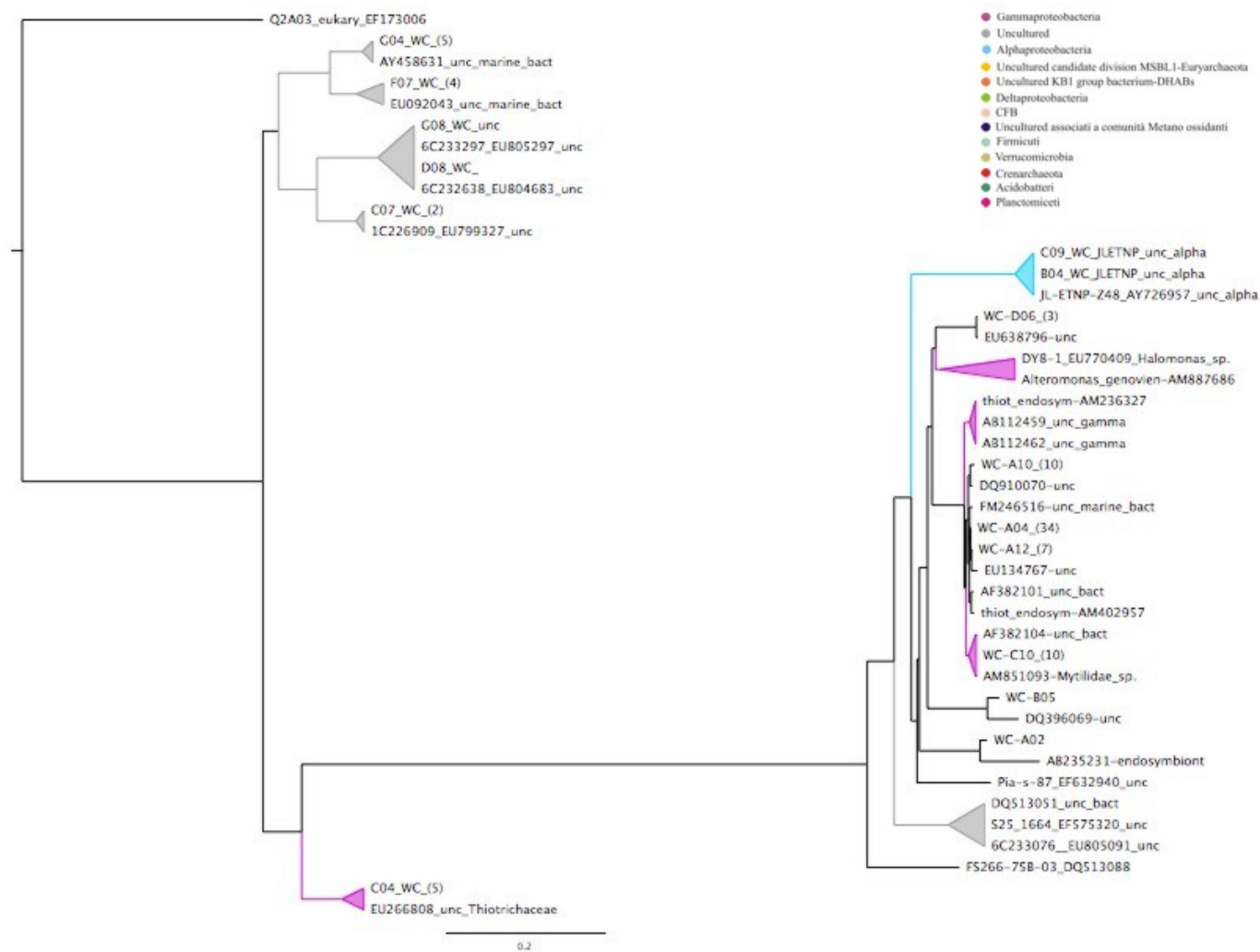


Fig. 27 – Albero filogenetico basato sulle sequenze di 16S rRNA ottenute dalla libreria di cloni del campione WCAST.



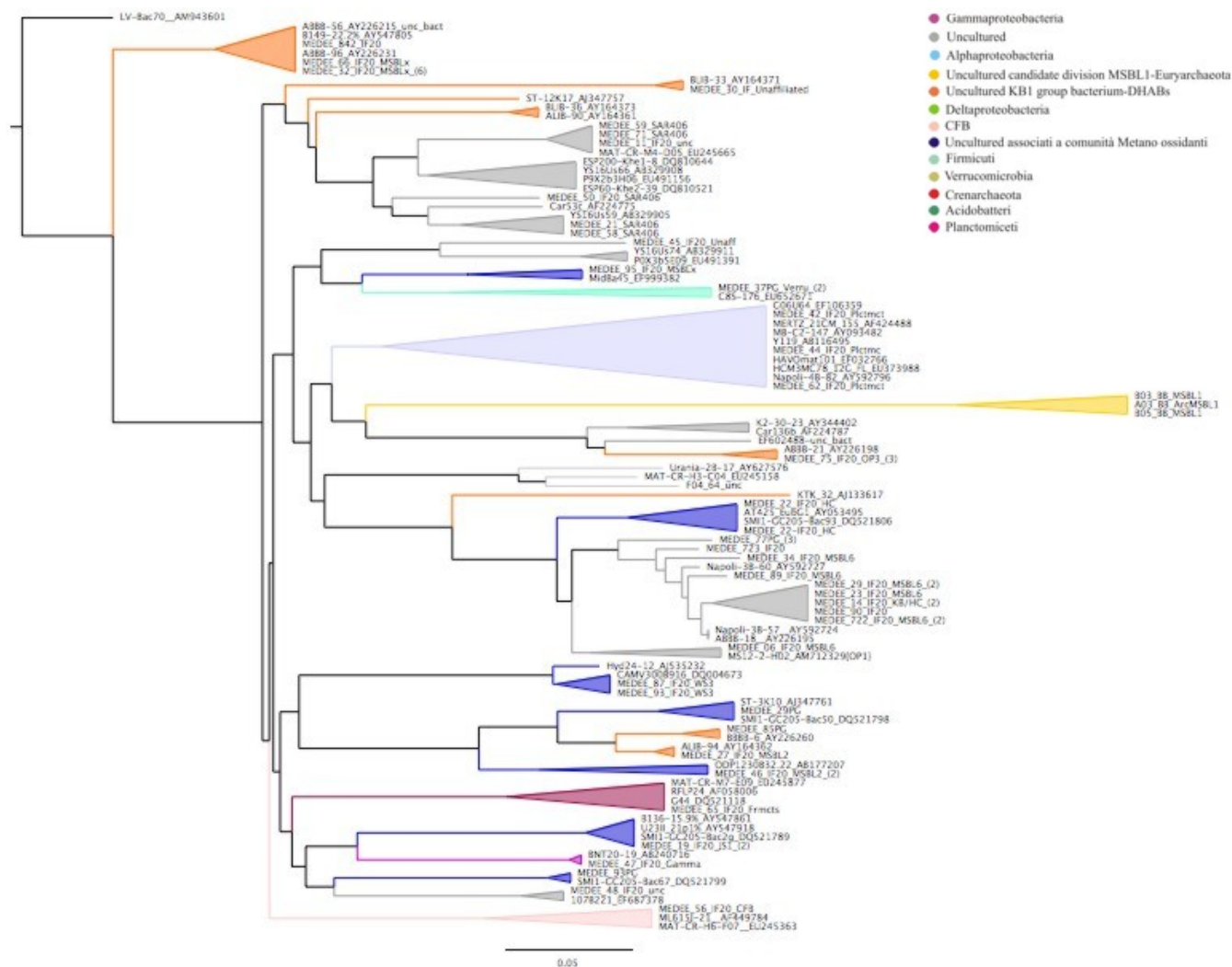


Fig. 28 – Albero filogenetico basato sulle sequenze di 16S rRNA ottenute dalla libreria di cloni del campione Interfaccia 21-22.

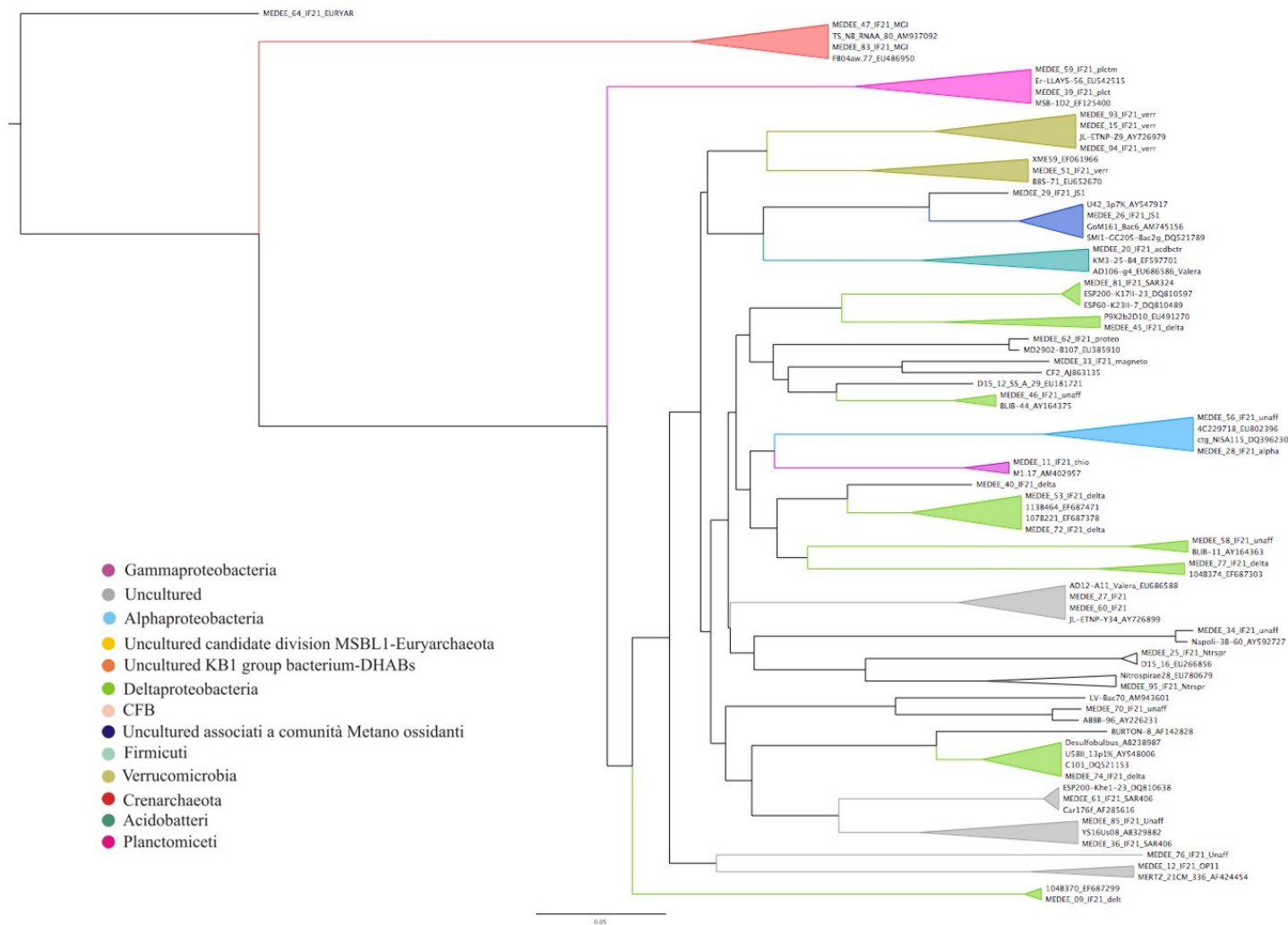


Fig. 29 – Albero filogenetico basato sulle sequenze di 16S rRNA ottenute dalla libreria di cloni del campione Interfaccia 20.

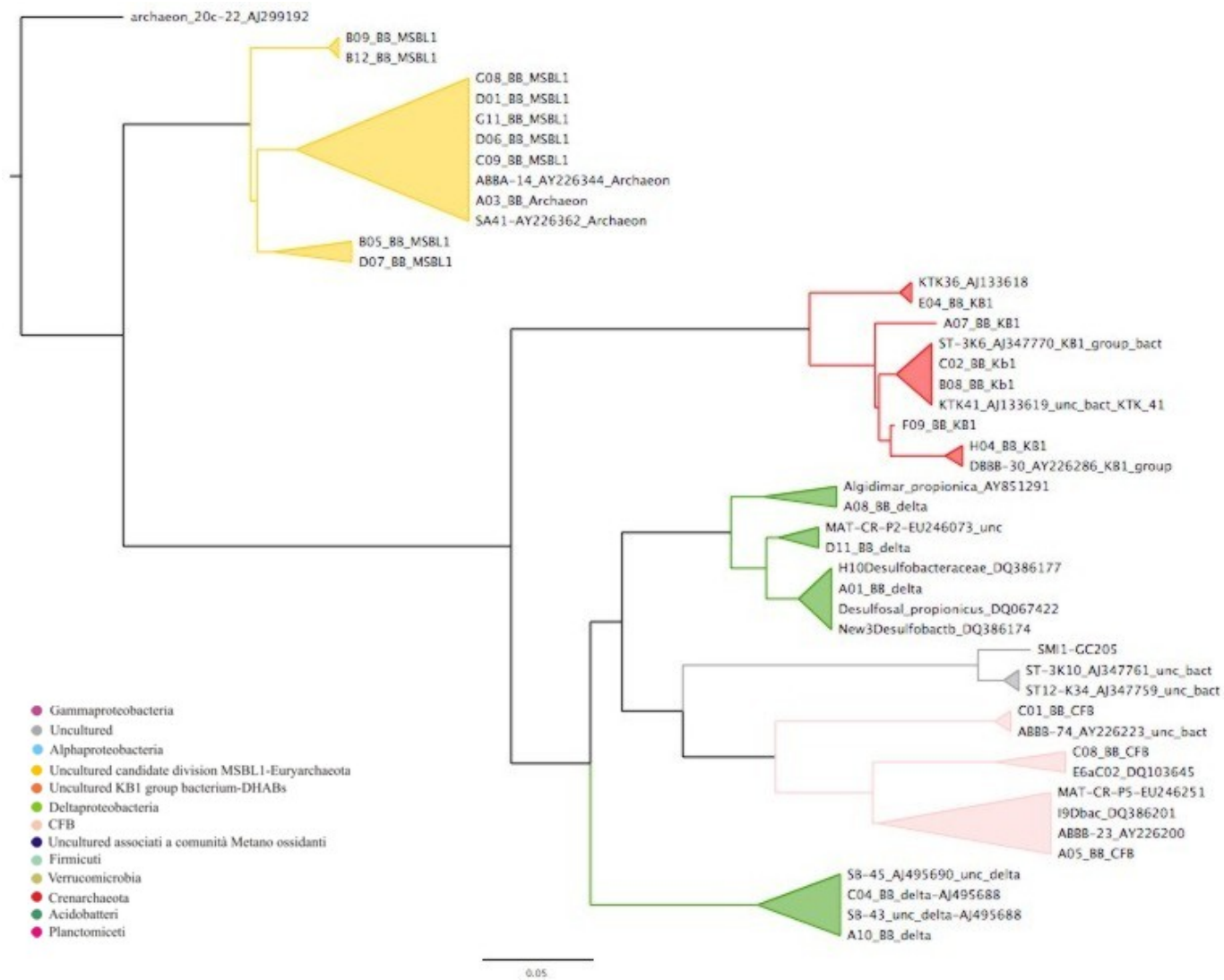


Fig. 30 – Albero filogenetico basato sulle sequenze di 16S rRNA ottenute dalla libreria di cloni del campione di Brina.

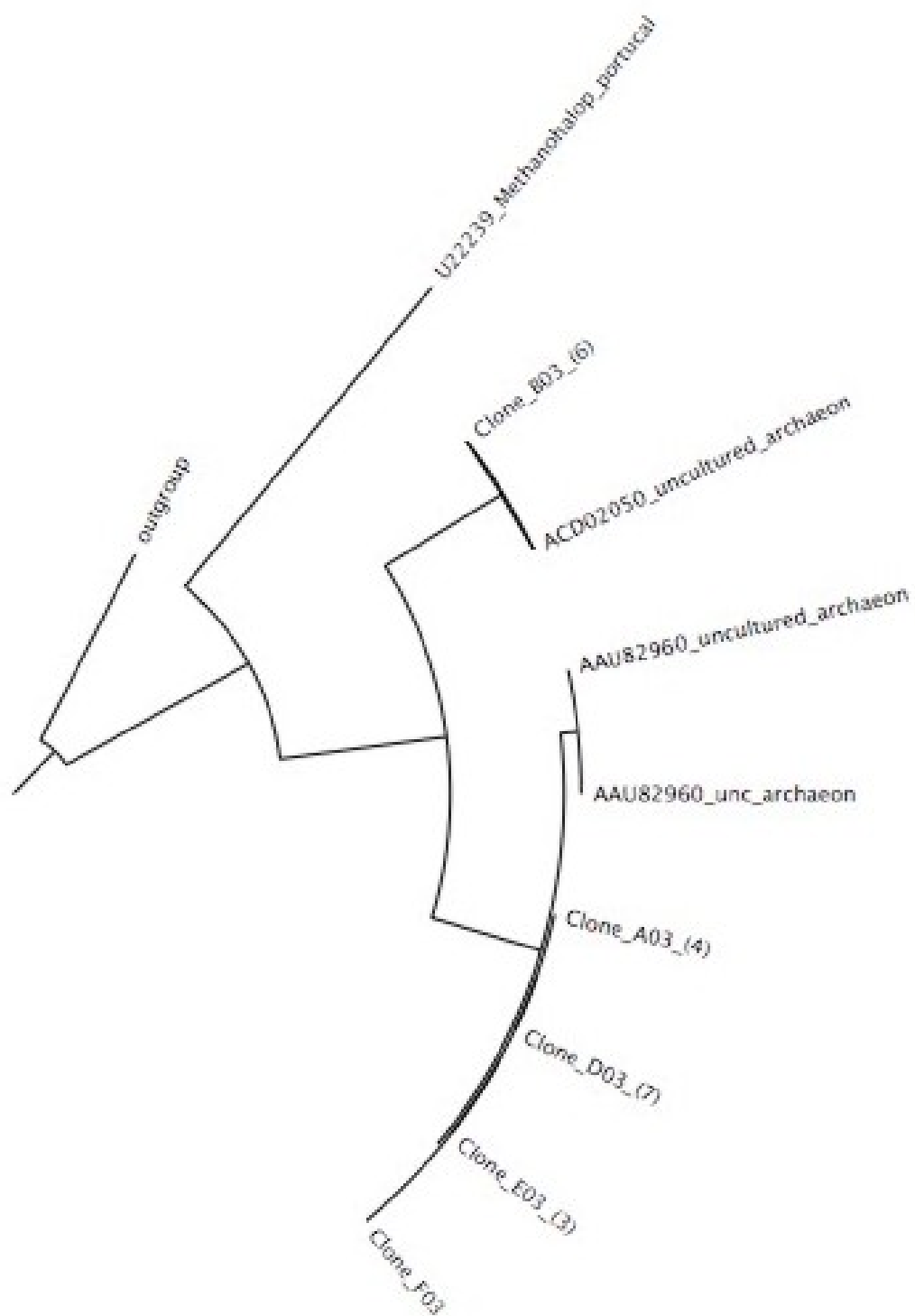


Fig. 31 – Albero filogenetico basato sulle sequenze amminoacidiche tradotte del gene *mcr* della libreria di cloni del campione di Brina

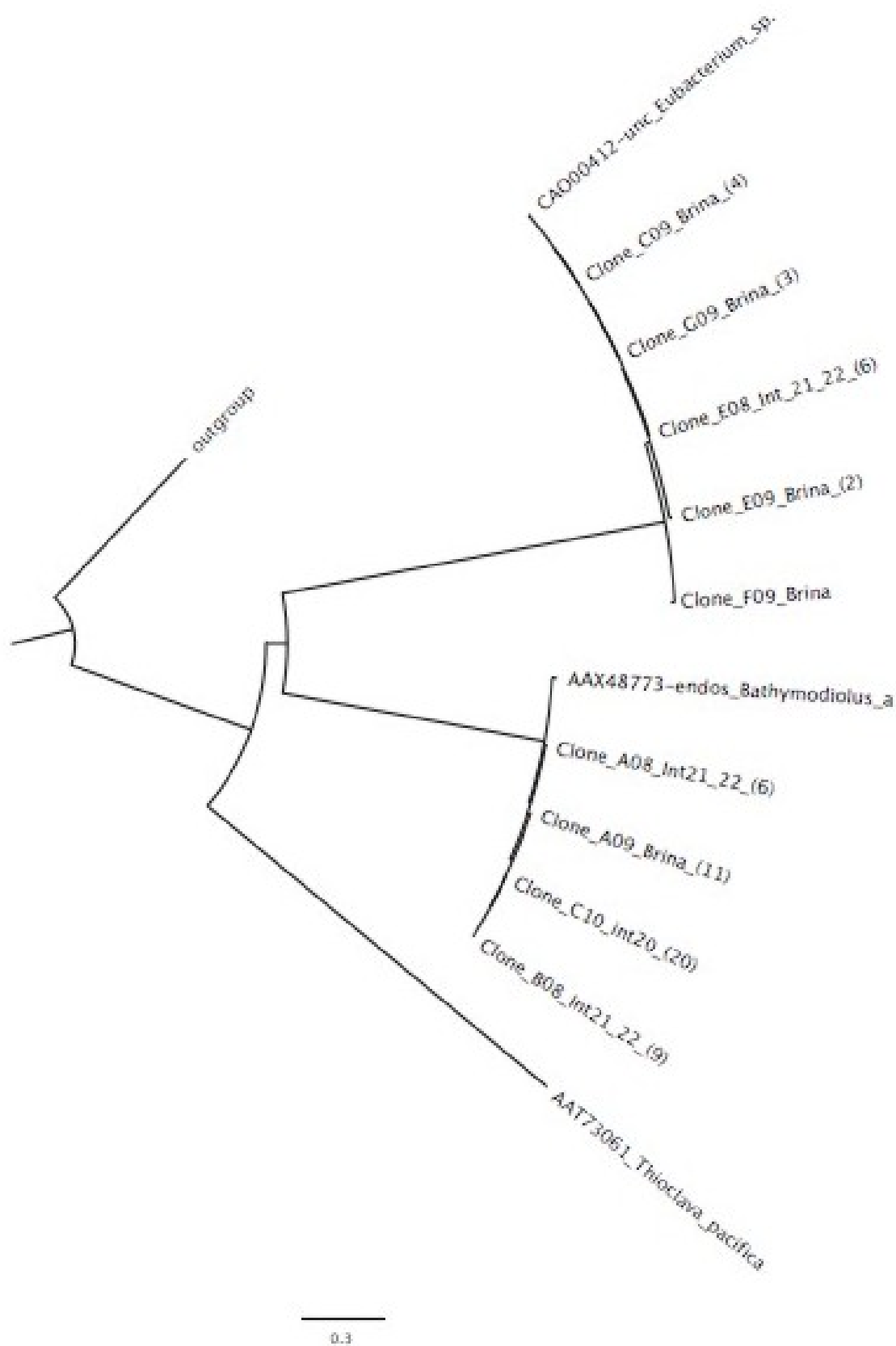


Fig. 32 - Albero filogenetico basato sulle sequenze amminoacidiche tradotte del gene *cbbL* delle librerie di cloni dei campioni di Brina, Interfaccia e acqua.

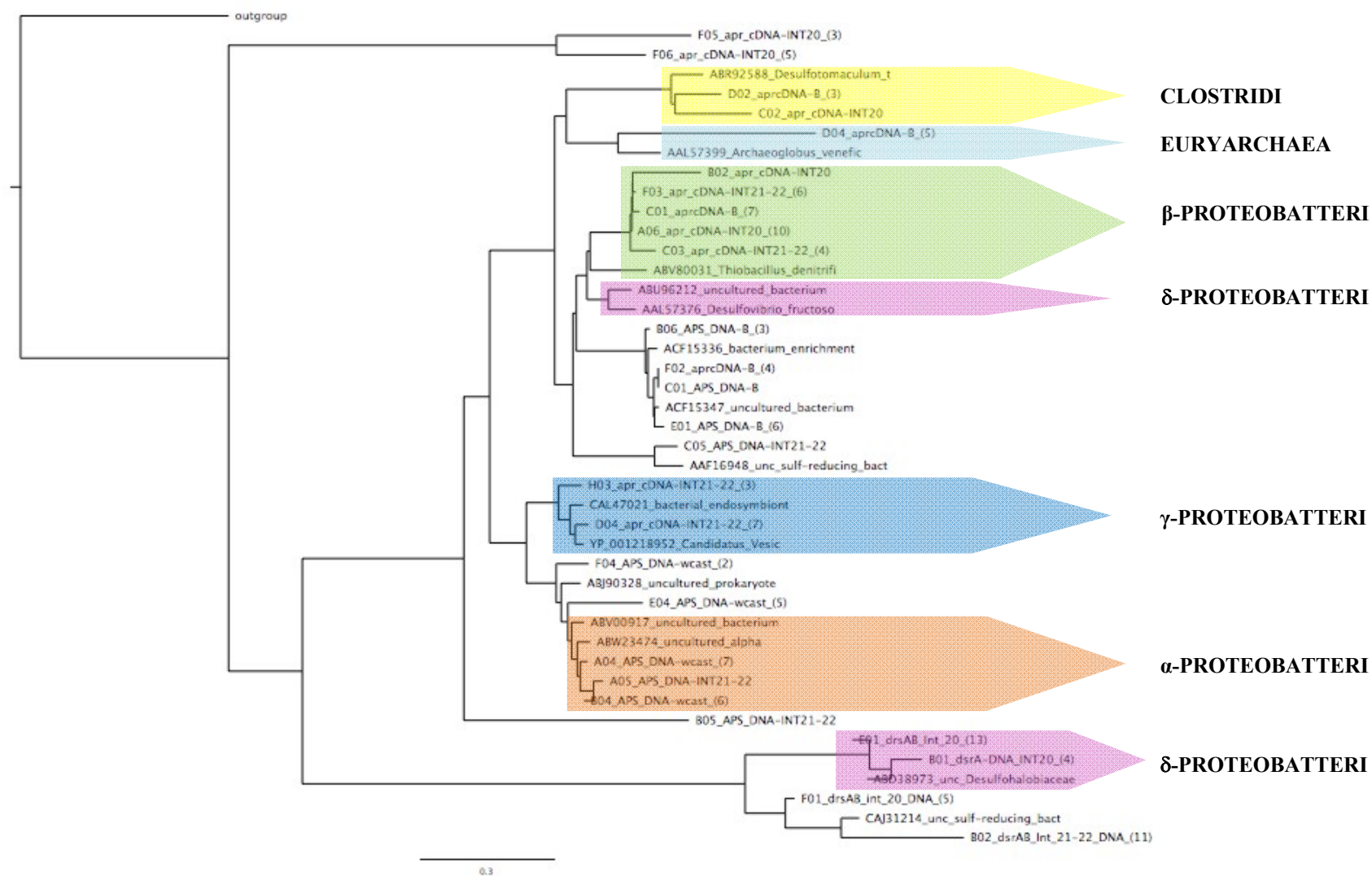


Fig. 33 – Albero filogenetico basato sulle sequenze amminoacidiche tradotte dei geni *dsrAB*, *apr* e *APS* delle librerie di cloni dei campioni di Brina, Interfaccia e acqua.

### **CAPITOLO 3 – TERZA FASE**

#### *“Progettazione del DHABs chip”*

Il GeoChip utilizzato nella prima fase del lavoro ha fornito dei risultati che concordano con quelli ottenuti nei precedenti studi, nonostante ciò si deve considerare il limite di applicabilità dell’FAGII ai bacini anossici, infatti, esso è stato progettato sulla base di sequenze per la maggior parte provenienti da organismi di acqua dolce, terreni e sedimenti. Poche sono le sequenze di micro organismi marini e addirittura nulle quelle di organismi che abitano gli ambienti estremi.

Partendo dal presupposto che il prodotto da ibridizzare deve essere il più puro possibile, il punto interrogativo era proprio se l’elevata concentrazione di sali presente nei campioni testati avrebbe influito negativamente sull’ibridazione del target alla sonda. I risultati ottenuti hanno dimostrato che questa tecnica può essere applicata anche ai DHABs, quindi unitamente ai dati ottenuti dagli studi passati effettuati sui bacini Urania, Bannock, L’Atalante e Discovery e dal campionamento sul bacino Medea sono stati selezionati (la raccolta è ancora in corso) dei possibili candidati per la costruzione di un chip in silico, specifico per i bacini anossici.

Questo chip potrebbe essere chiamato DHABs Chip.

### **3.1 Progettazione del Chip 50mer (Li et. al, 2005)**

La maggiore sfida nella progettazione di un chip è la selezione delle sonde per ogni gene in un gruppo di sequenze. Ci sono dei parametri che devono essere definiti, come per esempio l'identità di sequenza, l'energia libera, la temperatura di melting, il contenuto di GC, l'auto annealing, ecc. I criteri di scelta necessari ad una corretta progettazione sono stati determinati utilizzando il software CommOligo (<http://ieg.ou.edu/software.htm>). Il programma è in grado di costruire sonde di lunghezza variabile (8-123mer), nel mio caso ho scelto di progettare un chip contenente sonde della lunghezza di 50bp (50mer). Il programma permette di definire una serie di filtri necessari per la scelta delle sonde, tutte quelle che fuoriescono da questi parametri vengono filtrate e scartate.

## **3.2 DESCRIZIONE DEI PARAMETRI**

### **3.2.1 Scelta dei target**

Le sequenze isolate dalle analisi filogenetiche dei bacini sono state allineate con il software McVector e raggruppate in base alla percentuale di identità secondo i seguenti criteri: le sequenze con una percentuale di identità  $\leq$  al 90% sono state utilizzate per costruire delle sonde gene-specifiche; le sequenze con una percentuale di similarità  $\geq$  al 96% sono state utilizzate per costruire delle sonde gruppo-specifiche.

### **3.2.2 Ibridizzazione incrociata e self-annealing**

Uno dei parametri importanti da considerare è il **continuous matches**, (corrispondenze ricorrenti), esse altro non sono che dei tratti di sequenze, appunto ricorrenti, che potrebbero creare delle ibridizzazioni incrociate con dei NON-TARGET. Questi tratti potrebbero creare anche dei problemi di **self-annealing**, cioè una situazione in cui una sonda di appaia su se stessa perché contiene tratti complementari. Se l'oligonucleotide ha dei continuous matches più lunghi di quelli stabiliti dal programma viene automaticamente scartata.



### ***3.2.3 Identità di sequenza***

Il Software CommOligo calcola l'identità fra le sequenze ed i non-target utilizzando l'algoritmo Myers' bit-vector (Myers, 1999), il quale è considerato il più veloce nel calcolo degli allineamenti globali.

### ***3.2.4 Energia libera di legame***

Il calcolo della minima energia libera di legame fra la sonda ed il target dovrebbe essere calcolata considerando tutti i possibili allineamenti, ma è un metodo troppo lento per poterlo applicare. CommOligo esegue questo calcolo sulla base degli allineamenti che hanno un'elevata identità di omologia.

Il valore dell'energia libera viene calcolato alla temperatura di 37°C piuttosto che alla temperatura di ibridizzazione.

### ***3.2.5 Temperatura di melting $T_m$***

Per temperatura di melting si intende la temperatura alla quale il 50% delle molecole di DNA si trovano nello stato denaturato. Trovare la  $T_m$  ottimale è una fase importante affinché possa avvenire l'ibridizzazione. Il migliore intervallo di temperatura è quello che contiene il massimo numero di sonde ottimali. Se ci sono più intervalli ottimali viene scelto quello che contiene il numero maggiore di sequenze.

### ***3.2.6 Qualità e ottimizzazione delle sonde***

Dopo che tutti i parametri sono stati fissati si possono ottenere un numero di sonde superiore a quello necessario, in questo caso un ulteriore step di ottimizzazione selezionerà le sonde migliori. CommOligo seleziona le sonde secondo due criteri: quelle che presentano una minore ibridizzazione incrociata situata in differenti regioni vengono scelte per prime; per lo stesso target, le identità per ogni coppia di sonde deve essere inferiore ad una soglia fissata dall'utente. Per saper quanto sia buona una sonda viene assegnato un valore compreso fra 0 e 1.

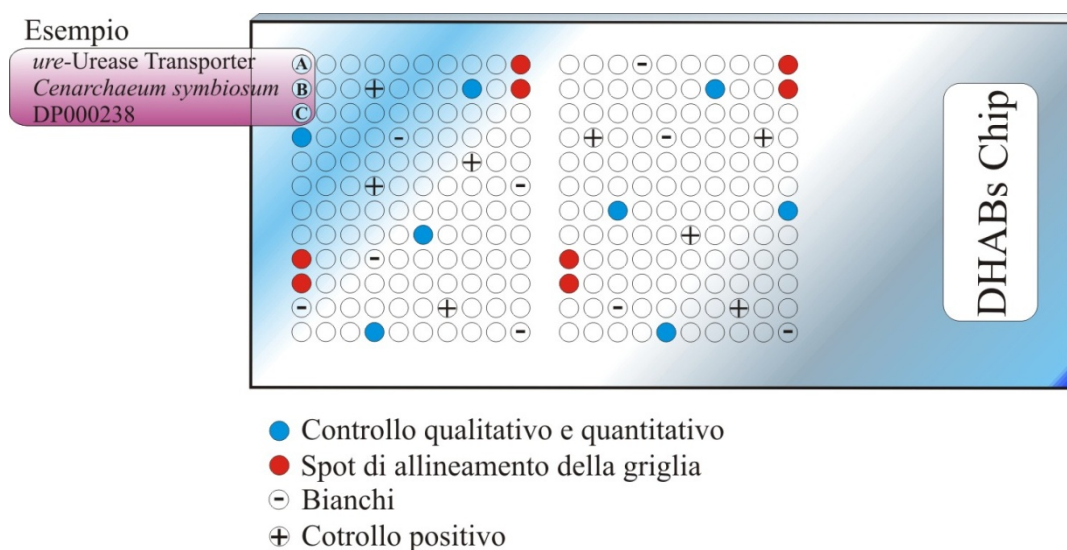
Nella progettazione delle sonde sono stati settati i seguenti parametri:

- 87% di identità di sequenza;
- Sequenze contigue della lunghezza massima di 17bp;
- Energia libera -29 kcal/mol

### 3.3 Chip 50mer DHABs

Fino a questo momento sono stati raccolti un totale di 268 geni, provenienti dai bacini anossici, selezionati in base ai parametri sopra citati, per ognuno di essi sono state scelte tre sonde. Il lavoro di raccolta dei geni è tutt'ora in corso.

In figura è rappresentato un modello per questo ipotetico chip array, come per l'FGAII ogni gene selezionato occupa una posizione prestabilita, sono anche stati inseriti degli spot di allineamento, rappresentati dal gene 16S rRNA, degli spot positivi, dei bianchi e degli spot per il controllo qualitativo e quantitativo.



Nelle pagine seguenti è riportata la lista dei geni selezionati nella progettazione di questo chip in silico.

Gene	Name	Oranism	Query	SEQ Probe I	SEQ Probe II	SEQ Probe III
<b>dsrA</b>	gruppo I	unc. Desulfobacteriaceae	DQ341056; DQ341043; DQ341045-49	GTGCCAACTGCTGCGTGGCTTCAATTGCACGTTCCGACCTCTCTTTAT	AGCCCTTAAAATTGGTAAAGAGACAGGCTGCTCCATGCTTATCGGTGCC	CAGGGATTCCAGACTCTTCTTGAGGTAAGTGGTCTTAAGGCTCTACCCC
<b>dsrA</b>	gruppoII	Desulfohalobiaceae	DQ341053-54	CATCCAGAAGGAGGTCTCGATCTGTGCCCCACCAAATGCATGTGGATGGA	TATACCTTTCATGAAGATGGAGGAGCCATACGATGATCTCAAGGAAGTCAT	GTGGCTGGCCGGTGAACAAGGCGATATGCAAGATTTTCAGGAAACGCCATC
<b>dsrA</b>	1.60MDsr51	Unc. Desulfohalobiaceae	DQ341044	AACAAATACGTGGAAAAAGATCCGGCGTATCCGGCCAATGCAGGTGCC	CCCGGTGCATGCACTGTATCAATGTCATGCCGAGAGCACTGAAATCGGCA	GAAGAAGCTAAGAACCCTGAACGTCTCGGCGAGCTGATCATGCCAGGGC
<b>dsrA</b>	1.60MDsr54	unc. bact.	DQ341051	GCCCGTGCAGACATATCCATCATCGGAACATGGAAAGATGACATCCGAATT	GAAGAGGGCAAGGCGCGTGAACGTGTCGGCGAATTTATCCAGCGTGTGGG	GAAGAGGGCAAGGCGCGTGAACGTGTCGGCGAATTTATCCAGCGTGTGGG
<b>dsrA</b>	gruppoIII	Desulfohalobiaceae	AF218452; AF418202; AJ310430	CACCAACATGCATGGTTCCACCGGTGACATGATCTTCTCG	CAGGAAGTCTGCAACAGCCTGACCCAGCGCTATCAGGACGAGATCCATCGT	AGCATACGCATCGACCAGGCCGTGTGCAGAAGTACATTGCCAACGACTCG
<b>dsrA</b>	Desulfofustis glycolicus	Desulfohalobiaceae	AF482457	CGGATATGCCGAAAAATCCCGGCGTCCAGCACTTCATACGATCCGTG	ATCGAACCTGCGGACCCGCGCTGCTCGCTCGTTCTTCTGTTGTGAATG	CTCCGGTTCGCCAACGACTGTGTCGGGCCATTGCCGTTCCGATATATC
<b>dsrA</b>	Desulfohalobium propionicus	Desulfohalobiaceae	AF218452	GAGAAGTACGGTTCGGCGTCACCAACATGCATGGTTCCACCGGTGACATG	GACGAGATCCATCGTCCGGCTTCCCTACAAGTTTAAATCAAATCTCC	GGGACGTGACTGGGTAAATTCGATATTCAGAAAGAGGTTATCGATCTCTG
<b>dsrA</b>	Desulforhopalus vacuolatus	Desulfohalobiaceae	AF334594	ACCAAGTTTCTGCGTCACGTTTCTGATTGTGGGAGAAACATGGTTCTGGT	ATAACCTCACCATGCATTATCAGGATGAGTCCATCGTCTGCAATCCCGT	AACGGTGGTGTCACTCCGGTGTGACTGGGTAAATTTGATATTCAGAAA
<b>dsrA</b>	WDV-I	unc. sulf-red bact	AY590506-07	CCTGACAAATTCCTTCATTGCACATTTTCATACCATGCG	TGCATCGGCACCTTTACCGAACAGCTGGAGCCATTTTTATGAATGGGG	TTCAGCAGGATCTGGGCGGATCCGGTTCCAATCTGCGTACACCGCCTGCT
<b>dsrA</b>	unc. I	sulf-red bact mXyS1	AF482456	TTTTTTATGAGCTGGGGCAGCTCTTCAGCAGGATCTGGGCGATCCGGTT	CGTGGCCTCATTGCGAGTCCGACATGAGCTTTATCGGCACCTGGAAGA	GTAATTCGACATCGATAAGGAAGTATCAACCTCTGCCCCACCACTGCA
<b>dsrA</b>	WDV-AI-DSR 60	unc. sulf-red bact	AY590508	CACCAAGTATTACCTTAGATCTATCTGCGATCTCTGGGAATACCGCGGAG	GGCATGTGCTCCAGCAGGACCTGGGCGGTCAGGTTCAAACCTGAGGACCC	GAGCTTCACCGCCTGCCTTCCGTACAAATTTAAATTTAAATTCGACGGA
<b>dsrA</b>	WDV-II	unc. sulf-red bact	AY592536-39	GTITCCCGGTGTGGCCACTTCACACCATGCGAGTGAACAGCCCAACGG	CCCTACAAGTTCAAGTTCAAGTTCGACGCTGCCCAACGGCTGCGTCGCC	
<b>dsrA</b>	WDV-III	unc. sulf-red bact	AY590543-45	CCAGCCTTCTGGTAAATTTCACTACCTACCGAGAACTGCGGGCGCTTTGTGA	TCCGGGGTAATGAATATGCATGGTTCTACTGGTGACACCATCTTTATTGGT	CGCCCGCCTTCTCTACAAGTTTAAATTCAAATTTCCGGTTGCCCAAT
<b>dsrA</b>	WDV-IV	unc. sulf-red bact	AY590532-34	TGTGGCTCATTTTCACACCTGCGCGTGAATCAGCCTTCGGAAAACTA	ACGGTGCCACAGGGGACATAGTTTTCTGGGAACGCGCACCGAACAGCTGG A	TCGCCGGCCTTCCCGTACAAATTCAAATTCAAATTCGACGGCTGCCCAA
<b>dsrA</b>	WDV-V	unc. sulf-red bact	AY590524-25	CAGCTTTGCGATCTCTGGGAGCTTCGCGGAGCGGAATGACCAATATGCAT	CGAATTTGCTGCTACGATACCGAGGATCTTTCAGCTCATCTGACCAAGGA	TTGTCTTTATCGGAACATGGAGAGAGAGATCCAGATCGATCAGGAAGC
<b>dsrA</b>	WDV-UB-DSR 103	unc. sulf-red bact	AY590526	CATACCATGCGCGTCAACAGCCCTCGGGGCAATTTTACACCAACGAGTAC	CCACCAACCCGAGCTGGAAGAGACTTTTATGAGATGACCAATACATGG	CTATGACACAGTCCCTGTGTACCATCTGACCATGGAATATCAGGACGA
<b>dsrA</b>	WDV-VI	unc. sulf-red bact	AY590549-50	AAGTCCCGCGGTCCAGCAATTTCCACACCATTCGCGTCAATCAGCCTCCG	GTITTGACTTGGTGGTTCGGGCTCCGATCTGCGCAGCCCAAGCTGCTGA	GTCTATCATCGGCACCTGGAAGGGTGACATCCAGATGGACGAAGCCGAGT
<b>dsrA</b>	WDV-VII	unc. sulf-red bact	AY590520-21	ATTTCCATACCATGCGTGTCAATCAGCGGGAGGTAAATATTATACAACG	TTTTGGACAGGACCTTGCGGATCCGGKTCACCTGAGAACACCTGCTGA	TGCCAGGTCTGACATGCTTTTGTGGTACCTGGAAARACAAGATCCGCAT

<b>dsrA</b>	WDV-VIII	unc. sulf-red bact	AY590518-19	CAGCCAACCATGTTCCCGGTGTAGAGCACTTCACACCAT	AAGAGATCTTCTGGACACTGACCATGACCTGAATCAGGACCTTGGCGGAT	ATGCTTTTCATCGGAACATGGAAGACGACATCCAGGTGGATCAGGATGCC
<b>dsrA</b>	WDV-AI-DSR 18	unc. sulf-red bact	AY590522	AATATGCACGGATCTACAGGGGATATTATTTTCTGGGGACAACCACCG	CGCCGTTTCGGATATGCTCTTATCGGAACCTGGAAGACCGGATCCGGAT	AAAGGAAGTCACGGATCTTGTCCGACCCACTGCATGAAATGGGACGGCAA
<b>dsrA</b>	DesHalo	Desulfomicrobium baculatum	AB061530	GCTGACCATAACCTGAACCAGGACCTTGGCGGCTCCGGCTCAAACCTGCG	CCAACGGATGCGTAGCTTCTATTGCCGTTCTGACCTCTCTTTATCGGAA	GTCTTTTGATCTGCAGAAAGAGGTCATTGATCTGTGTCCACCGAGTGCA
<b>dsrA</b>	DesBact	Desulfotignum phosphitoxidans	AF420289	GTCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATTTGCGCAATGGGGGAA	GACGGTACCAGTGGAGGAAGCGCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGT	GTGAAATTCGTAGATATCAGGAGGAACCCGATGGCGAAGGCAGCTTTCTG
<b>dsrA</b>	DesBact_2	Desulfobacula phenolica	AJ237606	GGGGTAAAGGCCTACCAAGACTGCGATGGTTAGCTGGTCTGAGAGGATGAT	AGTGAAGAAGGCCCTTGGGTCTGAAGCTCTGTCGACAGGGAAGAAATTAT	GAAAGCCAGGGCTCAACCTGGAGCTGCATTGAAACAGCAAGACTTGAG
<b>dsrA</b>	DesBact_3	Desulfobacula toluolica	X70953	CGGGTGAGTAACACGTAGATAATCTACCTTAAGCCCGGGATAACTGCCCG	ATTAGTTTGTGGTGGGGTAAAGCCTACCAAGACTGCGATGGTTAGCTGG	AGCAACGCCCGTGAGTGAAGAAGGCCCTTGGGTCTGAAGCTCTGTCGAC
<b>dsrA</b>	DesBact_4	Desulfosalina propionicus	DQ386237	AAGCAGCTCTGTGATCTGTGGGAGATGAGAGGTTCCGGCATCACCAACATG	CCTTCCCTATAAGTTCAAGTTCAAGTTCGACGGCTGCCCAACTGCTGCG	CCTGTGCCGACCAATGCATGTGGTATGGAACGGCAAGCTGGAGATCGA
<b>dsrB</b>	gruppo I	unc.Desulfobacteriaceae	DQ341055-56; DQ341043; DQ341045-50	CGAAATATATACAATAAGAGTGGGCGGCTGCCGTCTGATGAGTACCACCA	GAACCCCTTAAAAATGATCTGGCTTCAGAAAATTTCCCGGTGGTTCCTT	
<b>dsrB</b>	gruppoll	Desulfohalobiaceae	DQ341052-54	GGATTACGGATATCGGGAATCACTACTATGGCGAGTTCTGCCCGCGTGA	TATTTTGATGCACAGGCAGAAAGTGAGATGAGGTCTACACTATAAGATG	ATCTCTGAGCCGGAAGCATTCCAAAGGCTCTTACAAGTTCCTCATCGGCG
<b>dsrB</b>	1.60MDsr51	unc. Desulfohalobiaceae	DQ341044	ATATCATCTGGATATGATCGGAACAACCGATGGAAAACAGAATAACTGAC	GTTCTGTTTATATGGCAGATTGAGGAGACGAGGTTATACGGTAAGAGTC	TATCGAGTTTATGATTGATTCAAAGGATAAGGTTGAGCTTTGAAAAATGA
<b>dsrB</b>	1.60MDsr54	unc. bact.	DQ341051	ACCGGATTACGGACATCGGGCCGCCGAATTACGAAGATTTTCTCCGCCAG	AGACAAATTGTATACCGTACGTGTCGGATCACCCGCTGCTGTCGATCAA	TTCTGCCACAGTCGAAGAGATGTCCAGAAGATTAAGGAGAGATGGAA
<b>dsrB</b>	gruppollI	Desulfohalobiaceae	AF218452; AF418202; AJ310430	ATCCTATGGAAGGTCGGATTACCGACTTGGGGCCGCGTACTATGGAGATT	CACCACCCGCAACAACGTCGAGTTCATGGTGACAGCAAGGAGAAAGTCGA	GCGGTCATGGACGATCTGTCGAGTATTCGGTTCATGTCGCTGCCTGCT
<b>dsrB</b>	Desulfofustis glycolicus	Desulfohalobiaceae	AF482457	GGGAAATGGTTGTGGCACGAGATCGTTCAACCCGCGCTCTGATGCATAAA	CGATGCCAAGGACAAGGTGACGCCGTTGCTTGACGATTTGGCCAGCCGCGG	CCCGGTCAAGGCGGTATGGACGAGCTGTCGAGTATTTACATCGATGAC
<b>dsrB</b>	Desulfohalobus propionicus	Desulfohalobiaceae	AF218452	ATCCTATGGAAGGTCGGATTACCGACTTGGGGCCGCGTACTATGGAGATT	GCGACGTGCCGACAAGCATTGCGATGGTACCTCTGTTTACCACCCGCA	GCCGGTCAAGGCGGTATGGACGATCTGTCGAGTATTTGGTTCATGTC
<b>dsrB</b>	Desulforhopalus vacuolatus	Desulfohalobiaceae	AF334594	ATCTGAAACCGGTGACGAAGTCTACACTGTACGTGTTGGTTGTGCCGCTCT	GATAAAGTTCAACCTCTGCTTGATACTCTGGCAAGCTATGGCAACAGCTAT	ACTTCTGCACAGGTACGATTGCCCTTGATGCTGCTGTAATATGTGTG
<b>dsrB</b>	clone GSL_27_23	unc. prokaryote	DQ386247	CGGGGATGAGGTCTATACTATCCGTTGCGGCACGACTCGCTTGGCAGCGT	GAGCCCTTGAAGCAGGATCTGCAGAGCCGGAAGAACGAAAGGGGTCTAC	TTCCGGTACGGTCAAGGTGTTCTGGACGAGCTTTTCGAGGAGTTCCAGAACA TGCGGCTG
<b>dsrB</b>	clone GSL_27_2	unc. prokaryote	DQ386255	CGGGGATGAGGTCTATACTATCCGTTGCGGCACGACTCGCTTGGCAGCGT	GAGCCCTTGAAGCAGGATCTGCAGAGCCGGAAGAACGAAAGGGGTCTAC	TTCCGGTACGGTCAAGGTGTTCTGGACGAGCTTTTCGAGGAGTTCCAGAACA TGCGGCTG
<b>dsrB</b>	clone GSL_I3	unc. prokaryote	DQ386225	GCGAGTACCTGCCTCCGTTATCAAGAACAACCTCGGCAAGTGGCAGTGCG	TCGCCCAGAGATCTGCGAGATCGCAGACAAGCACTGCGACGGCTATGTCC	CCGGCAACAGACGCTCGGGCACGGTGAAGGTGGTCATGGACGAGCTCTTT

<b>dsrB</b>	DesHalo	Desulfomicrobium baculatum	AB061530	CCGACTTCTTTCTCCGGTCATTGCCAAGAACAAGGGCAGTGGCTGTGGC	AATCTGCGCATCGCCGACAAGTTCTGCGGTGGTCACTGCGTTTCACCAC	GACGGCGGCAGCTACAAGTCCCCGTTGGCGGAACCGGCCCGGCATCACC
<b>dsrB</b>	clone DSR-O	unc. bact.	AY354095	GAACAACAAGGGCAAGTGGCTGTATCAGAGATCCCGAGCCGGCGTGCT	GTGACATCGCCGATGCCACTGTGACGGCTACCTGCGCTTACCACCCGGA	GGAACCGCGCCTGCGTCACCAACATCGTCCATACCAGGGCTGGGTACAC
<b>dsrB</b>	clone DSR-S	unc. bact.	AY354094-AB124932	GATCCGAATAATCCGATGGAAGGCCGATTACAGACCTTGGTCCGATAAG		
<b>dsrB</b>	DesBact_4	Desulfosalina propionicus	DQ386237	TCCGCCGGTCATCAAAAACAAGGGCAAGTGGCTGTACCATGAAGTTTT	<b>CGTTGAGTTTCATGGTTGACAGCAAGGACAAGGTCCAGCCGTTGATCGATGA</b>	CAGAACATGCGGCTGCCCCCATCTTCGGATTCTCTGGCCTGCTGCCTG
<b>16S_Desulfosalina</b>	Des-16S	Desulfosalina propionicus	DQ067422	GATAACATCACGGAAGCTTCGGTTTTTGAGATCAAAGATGGCCTCTGCATG	<b>GCAACCCTGACGCGACGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTA</b>	CCTGTTAAGTCAGTTGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCCCGGAAGTGC GACTG
<b>mcrA</b>	gruppo I	Methanosarcinaceae	DQ340983-88; EU147808; EU147804; EU147796; EU147812; EU147812; EU147811	TATGACGTTGAATACATCAACGACAAGTATGACGGTGACGTGACAAGGGT	ATCCCAGAGAGCAACCGTCCTGTCCGAGCCGCGGTAGTGCAGGATCCCT	
<b>mcrA</b>	Methanohalophilus	Methanohalophilus	U22259-39-54	TACTATGACGTTGAATACATCAACGACAAGTATGACGGTGC	TCGCAACAGAGTCCCACTCTACGGTCTCGAGAACTACGAGAAATACCCAG	GCAGGATCCCTTGCAACCGGTAACGCAACCGCGTCTCTCCGATGGTA
<b>mcrA</b>	gruppo II	unc. euryarchaeote	EU147997-17-66-87-39-21-83-80	AGCTGCATACCAACAACATTCTGGATGACAACCTGTACT	TGTTATCAAGGATATCGCAACAGAATCCCACTCTATGGTCTCGAGAACTA	TACCTGCACAAGGAAGGTCACGGAGCTCTCGGATTCTCGGATTCGACCTG
<b>mcrA</b>	gruppo III	unc. euryarchaeote	EU147906;EU147913;EU147920;EU147930;EU147933;EU147937;EU147938;EU147951;EU147916;EU147931;EU147949	CAACCTGTACTATGACGTTGAATACATCAACGACAAGTATGATGGTGACGCCGACAAGGGT	ACGAGAAATACCCAGTTGCCCTGAAGACCCTTCGGTGGATCCAGAGAG	CGGACGTCTCGGTTCTTCGGATTGCACTTGACGAGCCAGTGTGGTCAAC
<b>16S-water</b>	gruppo I 16S	Unc. archaeon	DQ340989; DQ536433; AB019725; AB019724; U71118; EF645849; EF069381; EF069343	TCCAAATGATTATCGCCGTAGGATGGGACTGCGGCCTATCAGTTTGTGG	AGACACGGACCCAGGCCCTATGGGCGCRGACGGCGAGAAAACCTTGCAAT	CAGCACTCAAGTGGTCAGGATGATTATGGGCCTAAAGCATCCGTAGCCG
<b>16S-water</b>	gruppo II 16S	Unc. archaeon	DQ340990-96; AF1191269126	ATGATTTATCGCCGTAGGATGGGACTGCGGCCTATCAGTTTGTGGTGAGG	CGCAGCAGGCGAGAAAACCTTGCAATGTGCGAAAGCACACAAGGTTAATC	TGCCGGGAATACTGCAGAGTAGGGAGTGGGAGAGGTAGACGGTACTCGGG
<b>16S-brina</b>	gruppo III 16S	unc. Methanosarcinaceae	DQ341008; DQ341010;	GGCGGCCGAGTGGTAATCACTATTATTGGGTCTAAAGGGTCCGTAGCCGG	GTAAGAGGTACTACAGGGGTAGGAGTGAAATCTGTAATCCCTGTGGGACC	GAAGCCGTGAAGCGAGCCACCTGGGAAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTTA

		archaeon	DQ341018			
16S-brina	gruppo IV 16S	unc. Methanosarcinaceae archaeon	DQ341000-04; DQ341006-07-13- 14-16	AGGTTACTGCTATCGGTGTCGACTAAGCCATGCTAGTTAAATGTTCTTCG	AATCCAGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACACTGCGGGAA	TCAGGTGCCGAGGGAAGCCGTGAAGCGAGCCACCTGGGAAGTACGGCCGC
16S-brina	gruppo V 16S	Methanohalophilus	M59132; M59133; X98192	CCTATCAGGTTGTAGTGGGCTAGAGTACCTACTAGCCAACGACGGGTACG	TAAACCCGGCGGCCGAGTGGTAATCACTATTATTGGGTCTAAAGGGTCCG	TGAGAGGAGGTGCATGGCCGTCGTCACTGTGTAAGCATCCTGTTW
16S-brina	gruppo VI 16S	Methanosarcinaceae	DQ341009-11-05- 12	ATCTGCCCTTGGGTTGAGCATAAGGGCGGGAACTGGGGATAATTCTGAAT	AGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACACTGGGGGAAACCGC	GTGGTAATCACTATTATTGGGTCTAAAGGGTCCGTAGCCGTTTAATCAGT
16S-brina	gruppo VII 16S	Halogeometricum	DQ340999; AF002984; EU170498	CGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGCCACCGTGCCGATAATCGGTACGG	TGAGAACCGTAAGGCGGTTCTGAATAAGAGCTGGGCAAGACCGGTGCCAG	AACAGATGGGCGTCCGGCGGAACTTCGTGGCTGGGACCGGAAGGCTCGA
16S-brina	gruppo VIII 16S	unc. archaeon	DQ340997-98	AGGGTTGGGAACTGACCGTAATACATTATAGAAGATTGATACTGGAATGT	TCCTGAGTGCTTTGCTTCGAGTAAAGCTTTGTCAAGTGTAAAAAGCTTG	GGCAATCATGTTTATTGGGTCTAAAGCGTTCGTAGCCTGTTTAATAAGTTC
16S-brina	clone pISA1	unidentified archaeon	AB019751	CCTAAGGGGTGCAGCAGGCGGGAAACCTTTACAATGCACGCAAGTGTGATA	AGGTACTCTTGGGTAAACGGTTAAATGTGATAACCCCAAGAGGACCACCGG	TTAATCAGACTCTACACCGTGAACCTCACCAGGAACGACGGCAGGATGAAG
MSBL1	gruppo I MSBL-1	unc. candidate division MSBL1 archaeon	AM268269; AY226367; AY164280; AY226377; AY226366; AY226348; AY164305; AM268268;AY164 305; AY226347	CGGGGGAGCACCAAGGGGTGGAGCTGCGGTTAATTGGATTCAACGCC	GCCCGCGTCAGCTCGTATCGTGAGACGTCTGTCAAGTCAGGTAAACGAGCG	TGCCGGGAACCTAAGGGGACCGCTGTCGATAAGACAGAGGAGGAGAGGG
MSBL1_2	gruppo II MSBL-1	unc. candidate division MSBL1 archaeon	AY164323; AY226377	CGAGGGTACTCCGGGGTAGCAGTGAAATGCTATAATCCTGGGGGACCGC	GCTCCTCGAGAGCGTCCGGTGCCGAAGGGAAGCCATTAAGCTACCGCCTG	CAAGTCAGGTAACGAGCGAGACCTCGCCCTAGTTGCCATCGGATTCCGC
MSBL1_3	gruppo III MSBL-1	unc. candidate division MSBL1 archaeon	AY164333; AY164308; AY164286; AY226359; AY226353	ATGCTATAATCCCTGGGGGACCGCCAGTGGCGAAAGCGCTCGGCGAAACCG	GGCGGGGAGCACCAAGGGGTGGAGCCTGCGGTTAATTGGATTCAACG	TGTCAAGTCAGGTAACGAGCGAGACCTCACCCCTAGTTGC
MSBL1_4	gruppo IV MSBL-1	unc. candidate division MSBL1 archaeon	AY164328; AY164283; AY164314; AY226376; AY226355	ATGCTATAATCTTCGGGGGACCGCCGGTGGCGAAAGCGCTCGGCGGGCCG	TGGATTCAACGCCGACATCTACCGGGGGCGACGGCAGAGTGAAGCCAA	TAAGGAGAGGAAGGAGAGGGCGACGGTAGGTCCGTATGCCCCGAATCCCC
MSBL1_5	gruppo V MSBL-1	unc. candidate division MSBL1 archaeon	AY164332; AY164316; AY226364; AY164275;	GAACCCGACGGTGAGGGACGAAGGCCAGGGGAGCGAACCGGATTAGATACC	GTGGTGATGCGCCCGTCAGCTCGTATCGTGAGACGTCTGTCAAGTCAG	GGGGGAGCCGATCCCTAAACCTGCGCCTAGTTCGATCGAGGGCTGCAACT

			AY226368			
<b>MSBL1_6</b>	gruppo VI MSBL-1	unc. candidate division MSBL1 archaeon	AY226381; AM268267; AY164325; AM268266	GAATGAAGGTCAGGCTGACGACTTTACTGGACTAGCCGAGAGGTAGTGCAT	CTAAGGCAGAGGAAGGAGAGGGCAACGGTAGGTCGGTATGCTCCGAATCCC	AAAGGGGAAGCCAACCTAAACCTACGCTCAGTTCGGATCGAGGGCTGAA
<b>urease</b>	urease transporter	Cenarchaeum symbiosum	DP000238	AGCTCCGAGTGGTTCAACACGGCAGGCCGGGTATAAAGACCGGCTGACT	CTGGTATGCCGAGGCGCGTCCATACAGGTGCTCTCTTTGGGATACTGGC	ATAAGGGCCAGGTACGGCAACGGCTCCCAAGGTCTTCTGGTGTTC
<b>urease</b>	urease accessory protein	Cenarchaeum symbiosum	DP000238	CGAGAGCAGCCTTGCAGTGATGCTGCGCCGCCGGGAGAAGTATGTGCC	AGAGTATCCGCCGAGTACTGCCTGCGCGCAGGTTATCTGCGGGGCTC	TTGCAAGGCGCACCTCTGAAAGTATCTGGATTTCGCGTATGGTATCACCT
<b>urease</b>	urease accessory protein_2	Cenarchaeum symbiosum	DP000238	GGGGTGCCCCGGGGGGCGCCAGGAGGGCGTGTGTATGATTCTTTCTGC	CAAGATCGGCGCCAACCATCCGGCAAGGTCGGTCTTGTATCAGCAAAA	ACGTGGTGGTATGTTGTGCGCCCGCTCTCTATTATGACCAGGTCGAGCT
<b>urease</b>	urease accessory protein_3	Cenarchaeum symbiosum	DP000238	ATTCCTTGGTCGCGTGCATATTGCGGGCTTAGCCGGTGGATCATCCCCT	AGCGGCCCTCTCCTTTGTACGCCAGGGCGTTGCGAGAGCGCAAAACGC	GCAGACGCTCCCGTCCCGGCGACTAATTCGAGCAGTGACAAGGCGG
<b>urease</b>	urease accessory protein_4	Cenarchaeum symbiosum	DP000238	CCGAGCAGGCGCCAAAGACCTCCGCCTCAGAGTCCGCCTGTATTGAAAG	CCTGTGCCTGTTCCCTATTACATGTCCGAGCAGTACTGCCGCCCAAAGTC	GGAGCCTGGCGCCCCCTGCTAGGCTTATGCCACGCTGTGCCCCGTCGG
<b>urease</b>	Urea amidohydrolase- gamma	Cenarchaeum symbiosum	DP000238	CAACGTGTTCTGTGGCGGCCGAGCTTGCCGCGAGAAGGATGGGCAGGGGCT	GAGCGTGCCCGAGCTTATGAGTCCGGGCGGGCGTCTGACAAGGGAGCA	ACATTCGAGGACGGCACCAAGTGGTGACCGTGACGACCCGATAGTGTGA
<b>urease</b>	Urea amidohydrolase- beta	Cenarchaeum symbiosum	DP000238	TTGTAGAAGATGAGCCCGTCATCGCCAACGGTAATAGGAAGACGGTCCGCG	CTTCCCAGATCAGAGGCGTACGGTTTTCGCCTCAACATACCGTCGGGCAC	TGGAGGGCCCGCTTGATGAGAACAGGGAAGAAGCGCTACGAGGGCCCGCG
<b>urease</b>	Urea amidohydrolase- alpha	Cenarchaeum symbiosum	DP000238	CGCTTGATCTTGATTACAAACGCGATAATAGCCGACCCATACTGGGGA	GGCGAGCATTACATCTGCACGCCGGGAACAGTGGATTGCGACGTACACTAT	TTTGGATTCTGGCAAAGGGAACGATTGATTGAAGGAGCGCTCATGGAC
<b>urease</b>	hypothetical urease accessory protein ureG	Sulfolobus tokodaii str. 7	NC_003106	TCAAGCTCTAACTCACTTCTATAATTTTAATTAATCGTCTATTCCATCT	CTCTACAAAAGGTGCTAAATCTATTTTGTTCACAACAAGTAAATCGCTTT	TCTAAATTTACTGAGGGGTCTTCTCTATTGCTGTATGAGGACAGCCACC
<b>urease</b>	urease accessory protein UreG	Metallosphaera sedula DSM 5348	CP000682	TATGGCAATATCTCCCTTGAGAACGAGAAATCCCCATCTTTACGGTGTAT	CCTTCTACCTGGAATATACGCTCCACAATGGTGGCACTTCCCTCAACGTA	TTTAACTTCGATGTCATATTCCAACCTCGTCGATTGGCCGACACTCCG
<b>urease</b>	urease accessory protein UreF	Metallosphaera sedula DSM 5348	CP000682	AGTATTCTTATGAGCTCTGCTGTGCCCTCGCGGTTTTAAGGCTGATAAAT	TGCCGACGTGTCTAAAAAAAATTGTGAAGTCGGCCAATGACGAAGTAA	TTCCCTAGGTAGAAATCTTAACCTTCCACTAGGTTATGGTAAATCTCA
<b>urease</b>	urease accessory protein UreF_2	Metallosphaera sedula DSM 5348	CP000682	CTCCAGTACCCGCGTAATCAGTTTCTGCTCTGTATGAAGTTTAGCGCTCC	TATCACCACAGGATAGTCTCCCTTAGACCTCTTAACTTCATTAACAAA	ATTCTGAAAGTTGTGACAATGAAGCCCTCCAGTCGATTCCCTCGTAATA
<b>urease</b>	urease, beta	Metallosphaera sedula DSM	CP000682	CAGGATTATGGTTATTTTTCGAGATATCTCAGGACCTTTGATTGTCAG	GGCTTGCAGTCCGAAGACATCATGCTTATTGCCCAAGATCGTGGAGGTA	CAGGTGTTCTCATATGTGTGGACTGTGAAGGTTTATGGGATTAGTTGA

	subunit	5348				
urease	urease, beta_2 subunit	Metallosphaera sedula DSM 5348	CP000682	CCCTCGACCTGCGGGCCCCACCTATAGGCCTTAACCTTTACCACTCTTGCC	GACCTCAAAGAAGTGATAATGGGAGCCCACTTGAATGGGTCTATCTCCCGT	CACCAACTTGGTCCCATCGGGGAAAGTGGCTTCAACTTGAACCACTCAAG
16S-Brina medea	unc._1	unc. organism	EU246073	GCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACTGGCACTGACACACGGGCCAGAC	CCACTGAAGGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGG	TGAAACTGTCAGGCTTGAGTATGGTAGAGGGAAGTGAATTCTGGTGTAG
16S-brina medea	unc._Des	unc. Desulfobacteraceae	DQ386177	TCCGTGGTTAACAGCCACGGAAGCTGACGGTACCCTGAAGGAAGCACCGG	AGTCAGTTGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCCCGAAAGTGCAGCTGAACTGG	CACGCAGTAAACGGTGATCACTAGGTGTTGCGGGCTTTGATGCTGCAGTG
16S-brina medea	unc._2	unc. organism	EU246249	GGGTGCGTAACAGTAAGTAACCTGCCCTGAGTGGGGGACAACCCAGGGA	AGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCACTCTACGGGAGGCAGCAGCA	AGAAGCTCTGACGGTACCCGAGGAATAAGCCTCGGCTAATCAGTGCCAGC
16S-brina medea	unc._3	unc. MSBL5	DQ289361	CATGACATGCTTGGGAATCCCCCTGAAAGGGGGAGTGCTTCGGGAGCC	GCTCTCTCACAGGAGACTGCCCCGAAAACGGGGAGGAAGGTGGGGATGAC	CGTCCTCAGTTCGGATTGGAGGCTGCAACTCGCCTCCATGAAGTCGGAGTT
16S-brina medea	Des_oleovorans	Desulfococcus oleovorans Hxd3	CP000859 (680920..682475)	GATGGTTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACTGGAACTGAGACACG	GCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGGGGTGCAAGCG	GCTTGAGTATGGGAGAGGGAAGTGAATTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCG
16S-brina medea	unc._Des_2	unc. Desulfobacteraceae	DQ386176	GCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTATTGGGAATTACTGGCGT	GTGGAATTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCAGGAGGAACACCG	GATCACTAGGTGTTGCGGGCTTTGATGCTGCACTGCCGAGCAAACGCAT
16S-brina medea	unc._delta	unc. delta proteobact. clone ABBA-4	AY226207	CACCAGAGCGAAGGCGGCCCTGGACCGAAACTGACGCTGAGCGCGGAA	TCGTAGCTAACGCGTTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGCCG	ATCCCGGAATCCCCTGGAACAGGGGAGTGCCCTTCGGGGAACCCGGTGA
16S-brina medea	unc._delta2	Unc. delta proteobact. SB-29	AJ495675	CCAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTATTG	GTTGCGGAGAGGGCGCGGAACTCCCGGTGAGGGTGAAATCCGTAGATA	CCTGGTAGTCCACGCCGTAACATTGGGCGCTAGATGCTGGGGCGGTAGA
16S-brina medea	unc._delta3	Unc. delta proteobact. SB-15	AJ495661	TCAGGAGGGAAGAAAAGCAGATTCGGAACAGGGGTCTGTCTTGACGTACC	CGCGTAGCGGCTGCGCAAGTCAAGTGTGAAAGCCCTCGGCTAAACCGGGG	AAGGCGGCCGCTGGACCGAACTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGTAG
16S-brina medea	MSBL1	Unc. candidate division MSBL1 archaeon clone JBBA-105	AY226378	GCCAGGGGCGCGAACCAGGATTAGATACCCGGGTAGTCTGGCTGCAAGTA	GTCGCAAGACTGAACTTAAAGAAATTGGCGGGGAGCACCACAAGGGGTG	GTGCATGGCGCCGCCAGCTCGTATCGTGAGACGTCTGTCAAGTCAGGTA
16S-brina medea	MSBL1_2	Unc. candidate division MSBL1 archaeon clone BBBA-68	AY226363	CTGAGACAAGGCCCGCCCTACGGGCGCAGCAGGTGCGAAACTTCGCG	CTAAAGCGCCCTAGCCGGGTGCGCAAGTCTTTGTGAAATCGGACGCTT	CACAACTGCTATAATCTTGGGGGACCGCAGTGGCGAAAGCGCTCGACGAG
16S-brina medea	MSBL1_3	Unc. candidate division MSBL1 archaeon clone BBBA-46	AY226362	GCTCGGCTTGCAAGGAACTGTGAGTCTTGGGACTGGTAGGCGCTAGGG	CGAAAGCCAGGGGAGCAAACCGATTAGATACCCGGTAGTCTGCGCCGA	CTTAAAGAAATTGGCGGGGAGCACCACAAGTGGTGGAGCTGCGGTCTAA
16S-brina medea	MSBL1_4	Unc. candidate division MSBL1 archaeon clone ABBA-14	AY226344	GTCAGTCTTGGGACTGGTAGGCGCTAGGGTACTCCAGGGGTAGCGGTGAA	CCTGGCGCAAAGATGTGGGCTAGGTGCTTGGCTTCTCGAGAACGTCA	GCGACGCGAGAGTGAAGCCAAGCTGACGACTTTCGGGACTCGCCGAGGG



16S-brina medea	MSBL1_5	Unc. candidate division MSBL1 archaeon clone BLIA-54	AY164297	CCCGATAGGCGGGGTTCTGGAAAGGTCCCTCGTCGAAACGCTCCGGCGCT	GAGCGACTCCCAGTGCCGATGGTCTAACAATCGTCGGCTTTCTGGAACGTAA AAAGTTTC	TTTTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCCGGATCGGCAAGTCCCTTGTGAAA
16S-brina medea	MSBL1_6	Unc. candidate division MSBL1 archaeon clone ALIA-8	AY164289	CGCCGGACAACCTACCGGGGGCGACGGCAGTGTGAAGGCCAGGCTAAGGAC	ACGATGGGCTACTCTAGGGGAACCGCTGCCGATAAGGCAGAGGAAGGAGAG	GCTAATCCCTAAACCTACGCTTAGTTCGGATCGAGGGCTGAAACCCGCCCT
16S-brina medea	MSBL1_7	Unc. candidate division MSBL1 archaeon clone ALIA-103	AY164276	GGCCAGGGGAGCGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCTGGGTGTAAAGG	CTGAAACTTAAAGAAATTGGCGGGGAGCACCACAAGGGTGGAGCCTGCG	GGTGCATGGCCCGCTCAGCTCGTATCGTGAGACGTCTGTCAAGTCAGGT
16S-brina medea	KB1	Unc. KB1 clone ST-12K21	AJ347773	ACGGGAAACCGTTGTTAATATCCCATAACATGAGAGAACCAAGTTCTCTC	GGGGGCTGAGAGGGCGATCCCCCTCACTGGGACTGAGACACGCCCAGAC	AGCGCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGGTAAGACGAAGGGCGCAAGC
16S-brina medea	KB1_2	Unc. KB1 clone ST-3K22	AJ347772	GGAGATAGCAACGGGAAACCGTTGTTAATATCCCATAACATGAGAGAACCC	GAGGGCGATCCCCCTCACTGGGACTGAGACACGCCCAGACTCCTACGGGA	TTCTGGGGGACGAATGAGGCCAGCGTAATGGTTGGCCGATGACGGTACC
16S-brina medea	KB1_3	Unc. KB1 clone ST-3K7	AJ347771	ACGGGAAACCGTTGTTAATATCCCATAACATGAGAGAACCAAGTTCTCTC	GGGGGCTGAGAGGGCGATCCCCCTCACTGGGACTGAGACACGCCCAGAC	TTCTGGAGGACGAATAAGGCCAGCAGTAATGGTTGGCCGATGACGGTACT
16S-brina medea	KB1_4	Unc. KB1 clone ST-3K6	AJ347770	GGAGATAGCAACGGGAAACCGTTGTTAATATCCCATAACATGAGAGAACCC	GGGGGCTGAGAGGGCGATCCCCCTCACTGGGACTGAGACACGCCCAGAC	TTCTGGAGGACGAATAAGGCCAGCAGTAATGGTTGGCCGATGACGGTACT
16S-brina medea	KB1_5	Unc. KB1 clone DBBB-30	AY226286	TGCGTAGAGACCGAGAGGTACCCCGATGGTGAAGACAGCTTACTGGGCGTC	GGAATTGACGGGGGCCACACAACCGGTGGAGCACGTGGTTAATTTCGATG	TGGTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGGGACGTTGGTTAAGTCCCGTAACGAG
16S-brina medea	KTK	Unc. bact. 'KTK 41'	AJ133619	TCAAGTTCTCTCATCAAAGTGGCTTCGGCTACACCTGAAGATGGGGCTGCG	TCGAAAGGCTGACGCGGCGACGCCGCTGGAGGACGAAGGCCTTCGGGTTG	GCCAGTCAAGTCGAGTTGAAATTCCTCGGCTAACTGAGGAGGTACGTC
16S-brina medea	KTK_1	Unc. bact. 'KTK 36'	AJ133618	TCCGGGAAACTGGAGTTAATGTCCAATAACATCGGGGAATTTAAGTTCCCC	GGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCTGCAGTGGGGAATCTT	CCAGCAGCCGCGGTAAAGACGAAGGGCGCAAGCGTTATCCGGAATCACTGGG
16S-brina medea	KTK_2	Unc. bact. 'KTK 32'	AJ133617	CGAATAAGGTCAGTAGGTAATGGCTGACCGATGACGGTACCCAGGAACAA	ACGTAGAGGAAGGCGGAACCTCTCGGAGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGACCG	GCTTCAAACGATGTGGGCTTGGTGTCTGGCTCCCGACAGAGAGTCGTTGCCG
16S-brina medea	Unc. bact	Unc. bact. ST-3K10	AJ347761	GGAAGAGTATAGTGGCGAATGGGTGAGTAACGGTAGGTATCTACCCAATA	CTGCTTATGTGAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCAATGATG	ATGGACGAAAGTCTGATAGTGAACGCCGTGTGTGCGAAGAAGCCCTTCGG
16S-Int20 Medea	unc_des	unc. Desulfohalobus sp.	AB238987	AAGTGCGCAACGGGTGAGTAATGCATAGATAAATTGCCTTAAAGATTGGGA	GGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCC	CTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGGGGAGCAAGCGTTATCCGGAAT
16S-Int20 Medea	Hypersaline 16S_int 20	unc. bact.	AY226198; EF687299; AY547868; AY547784;AY226329	GCTCAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAACGAGATTAGATACCTGTGTAGTC	GACTACGGTCAAGACTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCTGCACAA	TCGTGCCGTGAGGTGTTCCCTTAAGTGGGAAAACGAGCGCAACCTCGTCC

16S-Int20 Medea	unc.	unc. bact.	AY547756; AY547869; EF687299; AY226198; AY547868; AY547867	AGCTAGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCTAGCTGTAAACG	GCGAGGAACCTTACCAGGGCTTGACATGCTGGAAGTAGCCACCGAAAGGA	CTGCCCCGCTTAAGTGGGAGGAAGGTGAGGATGACGTCAAGTCCGCATGGC
16S-Int20 Medea	unc._2	unc. bact.	DQ521789	CATCTCTCTTACAAGATAAGGAGATTAAAGATGGCCTCTCTATGCTAT	AGAGGATGTACGGCCACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCTACGGG	GTCAGATGTTAAATTACCAGGCTCAACCTGGTACTCCCATCTGAAACTTTA
brina- MEDEA-APS	Cloni (A06, C06, E01)-C6			CAGCCAAAAAGGCTATTGGCGAAGATAATATCTGGAAAGAGTTTTCATCG	GTCCGCGAAAAACAAAGTCTACATAATCAAGGCAAAGACCATGAAGGTTGCC	CCGGTTCACCTTATACCCTGTGCATGAAGGTTGGCGCCGAGCTTTCATGA
brina- MEDEA-APS		Desulfobact. indolicum	AF418123	GGCGAATCTTACAAGAGAATCGTTGCCGAAGCCGCAAAAAAGCATTGGGC	TTGGTTTCTCAGTACGTGAGAACAAAGTTTACATCATCAATGTAAACCA	CATACCATGTGTATGAAGGTGGGTGCTGAACTGTCCATGATGAAAAACC
brina- MEDEA-Apr	Cloni (C04, D04, E06, C06)-C9			GACCCAACGACCCCAACAGGGCTGCAGGGGCTGTAGTTTCAGCGTAAGA	GTCACAGGGTGAAGGCTTGGGTAGAAGCTGGTACGTCCATGGAACGCAGG	CTCCCCATGAAGATGGGAGCTGAGCTGACCCAGATGGATGTTAGGTTCTAT
brina- MEDEA-Apr		Archaeoglobus veneficus	EF442877	ATTCACGGTGAGTCTTACAAGCCCATCATCGTGAGGCTGCCAAGATGGCA	TTTCACGGTCAGAGAGGACAAGTTCTACGTATTCAAGGCCAAGGCAGTCAT	CACGATGGCTCTCTGGGCTGGTGTGAGCTGACCAGATGGAGCACAGGTT
brina- MEDEA-APS	Cloni (C06)-C6			ATGATTACGCGCAATCTATAAAAGGATTGTTGCAGAAGC	TGGTTTCTCGGTCCGCGAAAAACAAAGTCTACATAATCAAGGCAAAGACCAT	TTATACCTGTGCATGAAGGTTGGCGCCGAGCTTTCATGATGAAAAACCG
brina- MEDEA-APS		Desulfobact. indolicum	EF442911	CAAGAGAATCGTTGCCGAAGCCGCAAAAAAGCATTGGGCGATGACAATAT	GTACGTGAGAACAAAGTTTACATCATCAAATGTAAACCATGATGGTTGCC	ATACACCATGTGTATGAAGGTGGGTGCTGAACTGTCCATGATGAAAAACCG
brina- MEDEA-APS	Cloni (E04)-C9			GCCGTGGCTTCTCAACCGCGAGAACAAAGATCTACGTCTACAAAGCCAAT	TCCGTGGGCGAGGGCATGGGCCGAACCTGGTATCCGGTGTGGAACGCCGGT T	ACCATGATGAAAAACCGCTTCGTGCCCGCCGCTTCAAGGATGGCTACGGT
brina- MEDEA-APS		Unc. bact. clone P3T_050	EF551652	ATGGATCGTTGCTGAAGCCACCAAAAAAGCGCTCGGCATGGACCGCATCGA	AGATCTAGCTCTACAAGGCCAAGGCCATCCTGCTGGCCGCCGCGGTTGCG	GCCGAGGCCGGCGCGAGCTGACCATGATGAAAAACCGCTTCGTGCCCGCC
brina- MEDEA-Apr		Thiobacillus denitrificans	EF641922	GACCGCATCCAGGAGCGGATCTTCTCGTCAAGCTGGTCAATGACAAGAAC	TCCGTCCGCTTCCGTGGTGAAGGCACCGCGCTGCCTGGTACCCGGTGT	GACCATGATGAAAAACCGCTTCGTGCCCGCCGCTTCAAGGACGGTTACGG
brina- MEDEA-Apr	Cloni (B01)-C6			TACAAGCGGATTGTGCGAGAAGCCGCTAAAAAGGTACTCGGCGAAGACAAC	AAACAAGATCTATATCATCAAGGCCAAGACCATGATGGTGGCCTCGGCGG	ACCTATACCTGTGCATGAAGGTGCGGCTGAACTTTCAT
brina- MEDEA-Apr		unc. bact.	EF633056	GCCGAAGCCGCAAGAAGGCGCTTGGCGACGACAACATCTCGAGCGGGTT	AAACAAGGTGTACATCATCAAGTGCAAGACCATGATGGTGGCCTCGGCGG	ACCTATACCTGTGCATGAAGGTGCGGCGGAACTGTCCAT
brina- MEDEA-Apr	Cloni (A01, B06)- C6			TCCTACAAGCGGATCGTCGAGAAGCTGCTAAAAAGGCACTCGGCGAAGAC	CGGCTTTTCCGTCCGCGAAAAACAGATCTATATCATCAAGGCCAAGACCAT	CTATACCTGTGTATGAAGGTGCGCGGAGCTTCCCATGATGAAAAACCG
brina-		unc. bact.	EF633057			

MEDEA-Apr						
brina-MEDEA-Apr	Cloni (C01, D01)-C6			CGAATCCTACAAGCAAATCGTCGCGGAAGCCGCAAAAAAGCCATCGGCG	GGTTTTATTGTTGAGTGTCTGCTCGACAAAAAATGAAAACAGATTTC	GGCCAAAACGATGATGGTCGCTGCGGGCGCGATCAACATCTATCAGCC
brina-MEDEA-Apr		unc. bact.	EF633059	GTGAGAGCTACAACCCATTGTTGCCAACGCTGCGCGTAATCAGCAGATA	TAACGTCCTACCGGTGACTTCCAGCTCTCAGGGCAAAGGCAGTGATCGT	CTGCCTACGATTGTCGATCCAGGCGGGCGCCAAGATGACCCAGATGGAAA
int20-MEDEA-APS	Cloni (G02_C7)			TTGATCATGATTACGGCGAAAGCTACAAGGTCATCGTTGCCGAAGCCGCC	TCGCCGGATTGCCGTGCCGTCTTCTCAACCGCGAGAACAAGATCTACGTATACAAG	AACAAGATCTACGTATACAAGGCCAAGGCCATCATGTGCGCAGCCGGTGGG
int20-MEDEA-APS		unc. Thiobacillus sp.	DQ825796	GCCGAGGCCGCAAGAAGTCCCTGGGCCTGGACCGCATCCAGGAGCGCGTT	AAGGCCATCCTGCTGGCCGCGTGGTTGCGTGAACATCTT	GCCGAAGCCGGCGCGAGTTGACCATGATGAAAACCGCTTCGTTCCCGTC
int20-MEDEA-APS	Cloni (C02_C7)			TAAGATCATCGTTGCCGAGGCGCCAAGAAGCCCTTGGCAGAATGGGCGA	AGTGGGATTACGCGTAAGGGAAAACGAGTTCTACGTGTTCAAGGCCAAGGC	ACACCGGCTCCAGCACCTACTTTACCTGAAGGCAGGGGCTGAGATGACCT
int20-MEDEA-APS		Desulfotomaculum thermobenzoicum	EF442971	CCAAGAACTCCATCAACAGCCTGGCGACAAGGGCGAAATTTACGAGCGGG	CATGGGCGGCGCGTGCACGTATTCGGGCCCGTTCCACCGCGAAGGTCT	CGTACGGTTCAAGGATGCCTACGGTCCGGTGGGTGCCTGGTTCTGCTCTT
int20-MEDEA-APS	Clone (D02_C7)			TCGGCTTCTCAGCCGCGAGAACAGATCTACGTATACAAGCCAATGCCA	CAGCCGGTGGGGCCGTGAATGTCTTCGTCGCGTTCGGTGGGCGAGGGCA	AGTTGACCATGATGAAAAACCGCTTCGTGCCGCCCGCTTCAAGGATGGCT
int20-MEDEA-APS		unc. bact.	EF551598	GTGGATCGTGGCCGAGGCCGCAAGAAGGCCCTGGGCCTGGATCGCATCCA	CTTCTCCGTGCGCGAGAACAGATCTACGTCTACAAGGCCAAGGCCATCCT	GTTCCACCTACGCCATGGCCCGGAGGCCGGCCGAGCTGACCATGATGG
int20-MEDEA-APS	Clone (F02_C7)			ACCCGCGAGAACAAAGATCTACGTATACAAGCCAATGCCATCATGTGCGCA	GCGTTCGGTGGGCGAGGGCATGGGCCAACTGGTATCCGGTGTGGAACGC	GTTGACCATGATGAAAAACCGCTTCGTGCCGCCCGCTTCAAGGATGGCTA
int20-MEDEA-APS		unc. bact.	EF551652	GCTGAAGCCACAAAAAGCGCTCGGCATGGACCGCATCGAAGAACGTATC	CGCGAGAACAAAGATCTACGTCTACAAGGCCAAGGCCATCTGCTGGCCGCC	GTTCCACCTACGCCATGGCCCGGAGGCCGGCGCGAGCTGACCATGATGG
int20-MEDEA-AprA	Clone (B02_C7)			GAGCTGTTGCTGGATGCCAATGACGATCGCCGATTGCCGGTGCCGTCGGC	TGTGCGCAGCCGGTGGGGCCGTGAATGTCTTCGTCGCGTTCGGTGGGCG	GCGCCGAGTTGACCATGATGAAAAACCGCTTCGTGCCGCCCGCTTCAAGG
int20-MEDEA-AprA		Thiobacillus denitrificans	EF641922	AATCCTACAAGTGGATCGTTGCCGAAGCGACCAAGAAGGCGCTCGGCATGG	CTTCTCGACCCGCGACCACAAGGTCTACGTCTACAAGGCGAAGGCCATCCT	GCTCGACCTACGCCATGGCTGCCGAAGCCGGCGCCGAGCTGACCATGATGG
int21/22-MEDEA-APS	C05_C5			CGATCGTTGCTGAAGCCGCAAGAAAGCTCTCGAGATCAACAGGGAAGCAA	GTTGCAGCGGCAGTTGGTCTCAGCGTCAGAGAGAACAAAGATGTACATCTTCAAGGCCAAAG	GGGTTCCGGTTATGCGCTCGGCATGAGGCTGGTGCCAAGCTGACCCTCAT
int21/22-MEDEA-APS		unc. sulfate-reducing bact.	AF196341	AGGCTATCGTTGCTGAGGCAGCCAAGAAGCGCTTGAGATCAACAGGGCTG	TGCGGCAGCAGTCGGCTTACGCGTAAGAGAGAACAAAGATGTACATATTCAG	CTCAGGTTGAGGTTACGCGCTCGGTATGCAGGCAGGCGCACAGCTTACCTT
int21/22-	B03_C8			TGACAAGAACGATAAAAAACAGAGTGGCAGGCGCATCGGATTACGCGTGAG	CAGGCCCGGTCAACCGGAGAAGGTCTGGGCAGGGCCTGGTATCCGCCCTG	CAGGCCCGGTCAACCGGAGAAGGTCTGGGCAGGGCCTGGTATCCGCCCTG

MEDEA-APS						
int21/22-MEDEA-APS		Desulfotomaculum kuznetsovii	AF418152	GATCATCGTTGCCGAAGCTGCGAAGAAGCCCTGAATGCCCTCGTGCCCGA	CGCGAGAACAAAGTTCTATGTCTTCAAAGCAAAGCCGTTCTGGTGGGCATG	CTACTTCACGCTGAAGGCCGGCGCCGAAATGACCTGCCAGGAAGTGGCCTT
int21/22-MEDEA-APS	E03_C8			GTTGCTGAAGCTGCGACTAAACAAGCTGATAAAGTATACAACCGTATTATG	CAAATCTAAGCAACTATTGTTGGTGGTGGTGGTCTTAACATCTTTAA	CAAAAATGACACAAATGGAAAAATCGAATCGTATTAGCTCGATTAAAGATG
int21/22-MEDEA-APS		bacterial endosymbiont of Idas	AM402962	CAAGCCTATTGTTGCTGAAGCGGCAACTAAGAAGCTTGATAAGACATACAA	ACCACGTATTTAAATCTAAGGCTACTATCGTTGGTGGTGGTGGTCTCTA	GAAGCCGGTGCTAAGATGACACAAATGGAAAACCGTATTGTATTAGCTCGT
int21/22-MEDEA-APS	B05_C5			ATCCGCGGACAAAGTATTCAACCGGATCTGCGTCACCCACCTGCTGATGGA	CGGCGCATCCAATATCTTCGT-CCAAATTCGGTTGGTGAAGGCGCGGGACG	ATGACGCAGATGGAGAATCGCATCGTCTGGCTCGATTCAAGGACGGTTAC
int21/22-MEDEA-APS		unc. bact.	AY604064	CCGCCAAAAATCGGCGGACAAAGGTCTTCAACCGCATCTGCGTCACCCACC	GCGGCGCAGGCGGCGCTCCAATATCTTCAAACCGGTTCCGTGCGCGAAG	CCAAGATGACGCAGATGGAAAAATCGCATCGTGTGCTGCGCGTTCCTCAAGGACG
int21/22-MEDEA-APS	E05_C5			CAAGTTGGCTTTGGAAAATAACCGCAAGGCTACCGGTGTCGTCCAAATCA	ACAAAGTAATTATTTCAAATGCAAACTGCATTACTCGGAACCGGAGGATGTGTCAATGT	GCCGCCGAGTCCGGAGCAGAAATGACAATGATGGAAAATCGTTTTGTTCGG
int21/22-MEDEA-APS		unc. Thiobacillus sp	DQ825792	GTGAATCCTACAAGTGATTGTCGCCGAGGCAGCGAAGAAAGCATTGGGCC	TGGCTTTTCGGTGC GCGAGAACAAAGCTTTACGTCTACAAGGCCAAGGCAGT	CTGGCGCAGAAATGACCATGATGGAAAATCGTTTCGTGCCGGCTCGCTTCA
int21/22-MEDEA-APS	G05_C5			GAGAAAGCTACAAACCAATTGTTGCTGAAGCCGCTAAAAAGTCTGCTGACA	TAACATGCGTACTGGTAACTACCATGTCTCCGTGCCAAGCTGTTATTGT	CAGCTTATGCATTGCCGATTGCTGTTGGTGTCTAAAATGACTCAATGGAAA
int21/22-MEDEA-APS		unc. prokaryote	DQ995784	TAAGCCCATCGTTGCGGTAGCTGCGCGAAAAATCCGCCACGCAAACTACAA	ACCGGCGATTCTATGTGTTCCGCGCCAAGCGGTGATTGTGTCGCGGGC	GCTGCCGATTCTTGCCGGTGCCAAGATGATGCAGATGGAAAACCGCATCGT
int20-MEDEA-AprA	D05_C5			TGACCCACCTGCTGATGGACGAGGCGAAGCTCAACCGGGTCTGTTGGGCCG	CATCTTTAAGCCTCGTGGGTGCGGTGAAGGTATGGGGCGGACGTGGTATGC	
int20-MEDEA-AprA		unc. bact.	EF618624	CGAAGTCTACAACCGGATCATGGTGACCCACCTGCTGATGGACAAGACGAA	TCCGCGCCAAGGCCGTATCGTCTCCGCGGCGGTGCGTCGCACATCTACA	CGCAGATGGAGAACCGGATCGTCTTACCCGATTCAAGGACGGCTACGGTC
int20-MEDEA-AprA	A05_C5			TGCCCCAAAGGCCGCTTCAGAGATCTACAACCGCATCATGGTGACCCATCT	CCGTATCGTAGCCGCGGGTGGTGGTGCACATCTTTAAACCTCGTGGCGT	CAAGATGACGCAGATGGAGAACCGGATCGTCTTACTCGATTCAAGGACGG
int20-MEDEA-AprA		unc. bact.	EF618633	GCCGCCACCGAAGTCTACAACCGGATCATGGTGACCCACCTGCTGATGGAC	AGCCGCGGTGGCGGTGCGCATCTACAAGCCCCGTTGGTGGCGGAGGG	CAGATGGAGAACCGGATCGTACTACCAGATTCAAGGACGGCTACGGTCCA

int20-MEDEA-AprA	A03_C8			AGGCCTGTCTTGCGGTCGCCGAGGTGCTGTTACGCTTCCGGCCGCGGT	ATCCTCTCTCTACCTGACCACAACGGCCGCGCGAGATGACCTCACAGGA	
int20-MEDEA-AprA		unc. bact.	EF633043	CCGAGGCTGCAAAGAACGCAATGAAGACCTGGGCGAGAAGGGCCAGATCT	GGCTTCTCCGTGCGGGAGAAAGTTCTACGTCTTCAAAGCTAAGGCCGTC	CGGCGCGAGATGACCTGCCAGGAGGTACGCTTATCCCCGTACGTTCAA
int20-MEDEA-AprA	F05_C5			GAAAGCTACAACCAATTGTTGCTGAAGCCGCTAAAAATCTGCTGATAAA	GTCGGTGGTGCGGTGGGTTTTAACATGCGTACTGGTGACTACCATGTTTT	TACACCTGGAGTAATGGTTCAGCTTATGCATTACCGATTGCTGTTGGTGC
int20-MEDEA-AprA		unc. bact.	EF633090	ACGGTGAGAGCTACAACCCATTGTTGCCACGCTGCGCGTAAATCAGCAG	TTTAACGTCGTACCGTGACTTCCACGTCTCAGGCGAAAGGCAGTGATC	GCCTACGCATTGTGCATCCAGGCGGGCGCAAGATGACCCAGATGGAAAAC
int21/22-MEDEA-AprA	(C03, D03) C8			GCCGCCAAGAAAGCTTGGGCATGGACAGAATCCAAGAGCGGGTCTTCGTG	AAAGCCAATGCCATCATGTGCGCAGCCGGTGGGGCGTGAATGTTCCGT	ACCATGATGAAAACCGCTTCGTGCCGCCCGCTTCAAGGATGGTTATGGC
WCAST-MEDEA-APS	E04_C4			GGCGAGAGCTATAAGCCCATCGTCGCGAGGCGGCACGCAAGGCGGCGACC	GTTGCTACAGGTGATTTCTCGTCTTCGTGCGAAAGCCGTATTGTTGCA	TTTGCCAATCGATGTCGGGGCGAAGATGATGCAGATGAAAACCGCATCGT
WCAST-MEDEA-APS		unc. prokaryote	DQ995787	GTCGCCGAGGCGGCGCGCAAGGCCGCGACCGAGGTCTACAACCGCATCATG	CTATGTGTTCCGCGCAAGGCCGTGATCGTGGGTGCCGGTGGTGCCTGC	GTCGGCGCAAGATGACGCAGATGGAGAACCGCATCGTCTCACCCGGTTC
WCAST-MEDEA-APS	(A04)_C4			CAAGCCGATCGTCGCCGAGGCTGCCGCAAGGCCGCTTCAGAGATCTACAA	ACAGGAGATTTCTACGTTTTCTGTGCCAAGGCCGTATCGTATGTCCGGT	CAGCCTACGCTCTGCCGATTCTGGCCGGTGCCAAGATGACCCAGATGGAAA
WCAST-MEDEA-APS		unc. prokaryote	DQ995797	TAAGCCGATCGTCGCCGAGGCGGCCGCAAGGCCGCGACCCAGGTCTACAA	TCCAGTGTTCCGCGCAAGGCCGTATCGTCTCCGCGGCGCGCTGCGC	GGTGCCAAGATGACGCAGATGGAGAACCGCATTGTCTTGACCCGCTTCAAG
WCAST-MEDEA-AprA	F04_C4			CAAGCCGATCATCGCCGAGGCCGCCGCAAGGCCGCCACCGAGGTCTACAA	GACGGGAATTTCTACGTATTCGGTCCAAGCGGTATCGTAGCTGCCGGT	GCTGCCGATCCGGTCCGGCGCAAGATGACGCAGGTGGAGAACCGGATCGT
WCAST-MEDEA-AprA		unc. bact.	EF618625	CGTTGCCGAGGCCGCCGCAAGGCCGCCACCGAGGTCTACAACCGGATCAT	GGGATTTCTACGTCTTCGGTCCAAGGCCGTATCGTATGCGCGGTGGCG	GATGACGCAGATGGAGAACCGGATCGTCTCACCCGATTCAAGGACGGCTA
WCAST-MEDEA-AprA	(B04, C04)_C4			GCGAAAGCTACAAGCCGATCGTCGCCGAGGCTGCCGAAAGGCCGCTTCAG	GGTATGGGACGGACGTGGTATGCCCGTGGAGCAGCGCTCTGCATATGCG	
WCAST-MEDEA-AprA		unc. bact.	EF618633	TCGCCGAGGCCGCCGCAAGGCCGCCACCGAAGTCTACAACCGGATCATGG	CTACGTCTTCGAGCCAAGGCCGTTATCGTAGCCCGGTTGGCGCTGCGCA	CAAGATGACGCAGATGGAGAACCGGATCGTACTACCAGATTCAAGGACGG

WCAST-MEDEA-AprA	D04_C4			GAAAGTTACAAGCCGATCGTGGCCGAGGCGGCCAGGAAAGCTGTACCGAA	GTTGCGGGTGCGGTGCGTTTCAATGTTGCAACGGGAGATTTCTATGTTTTTC	TCGGCTTATGCATTGCCGATACTTGTCGGTGCAAAATGACGCAGATGGAG
WCAST-MEDEA-AprA		Desulfotomaculum thermoacetoxidans	EF442969	TACAAGATCATCGTGGCCGAGGCCCAAGAACTCCATCAACAGCCTGGGC	GTCCGGGAGAACCAAGTTCTACGTCTTCAAGGCCAAGCCGTTCTGGTGGGC	CACCTACTTCACCTGAAGGCCGGCGCTGAAATGACCTGCCAGGAAGTGCG
WCAST-MEDEA-AprA		Thiococcus pfennigii	EF641942	ACAAGCCGATCGTCGAGAGGCCGAAGAAGTCCGCGGACAAGTCTTCA	CGTATTCAAGTCCAAGACTGTATCGTCGCCGAGGCGGTGCTCGAACAT	GCGAAGATGACCCAGATGGAGAACCGGATCGTCTGCGCGCTTCAAGGAC
Brina-MEDEA-cbbl	(A09, B09, D09)			GGAGAGCTCGTTTTGACTTCGTACAAGAAGTATCGAGAAAGCTGAAGCTG	GTGCAATGGTGTCAAGACAACGGTATGTTATTACATATTACCGTGCAATG	TAATCCCTGTAGCTTCTGGTGGTATTACGTATGGACATGCCAGCACTAG
Brina-MEDEA-cbbl		unc. prokaryote	AB175494	GAAACTGGTGAGCGTAAAGGTCACCTAAACGTTACAGCACCTACATCT	GCACGCAGTATTAGATCGTAACCCGCACCATGGTATCCACTTCCGTGTATT	GTAACATTTTCGGCGACGATTATGTCTACAGTTTGGTGGTACGTTA
Brina-MEDEA-cbbl	(C09, E09, G09)_C12, AM747274	unc. Eubact. sp.		AGCCTTTGAAATGGTCCGTGACAACGGTATGTTGCTACACGTTCMCCGC	GGTACTGTTGTTGGTAAGCTTGAAGGCGACCGCAAGCCACACTCGGCYGG	TACCTAGGCCACCCRTGGGTAACGCTGCTGGTGCGCCGCAACCGTGT
Brina-MEDEA-cbbl	F09_C12, AM747277	unc. Eubact. sp.		CGCGCATGCACGCGTTATCGATCGTCACCCGAAGCATGGTATCAACTTC	GGGGCCAGATGCCGGGTGTTATGCCTGTTGCTCCGGTGGTATCCACGTTT	AAAGCGCGCAACGAAGCCGTGAGCTTGAGAAGGAAGGCAAGATATTCTT
INT-MEDEA-cbbl	(A07, B07, C07, D07, E07, F07, G07)_C10; (B08, F08)_C11			CTCACAGCCGTTTCATGCGTTGGAGAGCTCGTTTTGACTTCGTACAAGAAGC	GGACTGCTAACACAGGTCTAGCGCAATGGTGTCAAGACAACGGTATGTTAT	CTGGGGCGCAATGCCGGGTGAATCCCTGAGCTTCTGGTGGTATTACGT
INT-MEDEA-cbbl		unc. prokaryote	AB175494	CTCACAGCCGTTTCATGCGTTGGAGAGCTCGTTTTGACTTCGTACAAGAAGC	GCACGCAGTATTAGATCGTAACCCGCACCATGGTATCCACTTCCGTGTATT	TCGGCGACGATTATGTCTACAGTTTGGTGGTACGTTAGGTACCCGT
INT-MEDEA-cbbl	A08_C11			TTCATGCGTTGGAGAGCTCGTTTTGACTTCGTACAAGAAGCTATCGAGAAA	GGACTGCTAACACAGGTCTAGCGCAATGGTGTCAAGACAACGGTATGTTAT	GTTGGATCGACATTATGCGTGATTATTATTAAAGAAGATCGTTCACGCG
INT-MEDEA-cbbl			AB176514			
INT-MEDEA-cbbl	(D08, E08)_C11; AM747274	unc. Eubact. sp.		AGCCTTTGAAATGGTCCGTGACAACGGTATGTTGCTACACGTTCMCCGC	GGCGACCGCAAGCCACACTCGGCTGGGTTGACCTTCTGCGCGACAATAC	CAATTCGGTGGTGGTACACTAGGCCACCATGGGTAACGCTGCTGGTGCG

INT20-MEDEA-IF1	(F01, H01)_C1			AAGGCCTCCGGCTGCCCCAACGACTGCGTCGCGCGATTGCCGATCCGAC	ACTGCGACCGGGAACCGACCGCGGAGCCACGATCTTATCGGTGCCAGGGC	GGGTTGGGTAAGTCTCTGGAGGAGATCGAGGTGGAGCCGATCCCGAAATG
INT20-MEDEA-IF1		unc. sulfate-reducing bact.	AB263178	TCTCGGGTTGCCCGAACGACTGCGTGGCTCCATCGCCAAGGCCGACATGT	GCTGCGACCGGGCAAGGATCGGGGAGCGACCGTACTGCTCGGGTCCAAGGC	TCCAGCGTGTGGTATGGGCAACTTCTCGAGGCCATCGAGCTGGAGCCGG
INT20-MEDEA-IF1	B01_C1; DQ341047	unc. Desulfohalobiaceae.		GTGGCTCAATTGCACGTTCCGACCTCTCTTTATCGGTACCTGGAAGAT	GCTCCATGCTTATCGGTGCCAAGGCTCTATTCTTGATGGTGCCAGATGG	CAGACTCTTTGAGGTAAGTGGTCTTAAGGCTCTACCCAGATGGTTCAA
INT20-MEDEA-IF1	E01_C1					
INT20-MEDEA-IF1		unc. Desulfohalobiaceae.	DQ341049	CTATAAATCAAGTTCAAATTTGATGGCTGTGCCAACTGCTGCGTGGCTTC	AACTGTTTATTGATAATCCCAATTGCACACGCTGCATGCACTGTATTAATG	ACTCTTTGAGGTAAGTGGTCTTAAGGCTCTACCCAGATGGTTCAATAT
Brina-MEDEA-mcr	A03_C3					
Brina-MEDEA-mcr		unc. archaeon	AY324363	CTGGAGGACTTCTGCTACAAGGGATGTGAAATCGGACTGGACTACGAGGC	CGCACTGACGCAGTACGAAGCGTATCCGACGGTTCGGAGTCGCACTTCGG	GGTCGCTGTCGAGTTGGGACACTATGAGCGTGTAGGAAGACTTGGATTCT
Brina-MEDEA-mcr	E03_C3			CTTCTGCTACAAGGGATGTGAGATAGGACTGGACTACGCAGACGGCGATAT	CGTACCCGACGGTTCGGGAATCTCACTTCGGTGGCTCGGTAGAGCGTGTCT	TATGCTGGGACACTATGAGCGTGTAGGAAGACTTGGTTTCTACGGCTACGA
Brina-MEDEA-mcr		unc. archaeon	AY324372	GGACTACGCAGACGGCGAGATGGCTTCGCTAAAGGGCGACAAGTTGAACAT	GCATGCGCAACAGGACTTACACAGCCGACCTTGAGTGCCTGGTCACTGTCT	
Brina-MEDEA-mcr	(D03, F03)_C3			GAGGACTTCTGCTACAAGGGATGTGAGATAGGACTGGACTACGCAGACGGC	GTGGCTCGGTTAGAGCGTGTGTGCAGACGGGGATGGTGTAGTCCCGTTG	
Brina-MEDEA-mcr		unc. archaeon	DQ521862	AACATCCTGGAGGACTTCTGCTACAAGGGATGTGAAATCGGACTGGACAAC	GATTACGCACTGACGCAGTACGAAGCGTACCCGACGGTTCGGAATCTCAC	TTGGGACACTACGAGCGTGTAGGAAGACTTGGATTCTACGGCTACGACCTG
Brina-MEDEA-mcr	B03_C3			GATGACAACCTGTACTATGACGTTGAGTACATCAACGACAAGTATGACGGT	CCAGTTGCCCTTGAAGACCACTTCGGTGGATCCAGAGAGCAACCGTCTT	TACCTGCACAAGGAAGGTCACGGACGTCTCGGTTTCTCGGATTGACCTG
Brina-MEDEA-mcr		Methanohalophilus halophilus	U22259	CTGGATGACAACCTGTACTATGACGTTGAATACATCAACGACAAGTATGAC	CTCTACGGTCTCGAGAACTACGAGAAATACCCAGTTGCCTTGAAGACCAC	TCTCTGTATGTACCTGCACAAGGAAGGTCACGGACGTCTCGGATTCTTCGG
Brina-MEDEA-mcr		Methanohalophilus portucalensis	U22239	GACAACCTGTACTATGACGTTGAATACATCAACGACAAGTATGACGGTGCA	CTCGAGAACTACGAGAAATACCCAGTTGCACTTGAAGACCACTTCGGTGA	TCTCTGTATGTACCTGCACAAGGAAGGTCACGGACGTCTCGGTTTCTTCGG
amo	CAT1-24			CAAACATTGATGCTTGCACTAGGTGCATCGTATTATCTGACATTTACTGGA	TGACTTCATCGTTACACCAAGTTGGCTTCGTCAGCAATGCTGTTGGATCT	CACGGTGGCAGATCCACTAGAGACTGCATTCAAGTATCCGAGACCAACGTT
amo		uncultured crenarchaeote	EU886048	CTAAACAATTACGCAGGAGACTACATCTTCTACTGATTGGGCTGGACA	GCTAAAGGTGCATGTTTCGTTTAGGTTACCATATGACTTCATCGTTACA	ACTAGAGACTGCATTCAAGTATCCGAGACCAACGTTACCACCATACATGAC
amo	CAT3-22			TCACAATCTACTATGCTTGTGCTAGGGGCGATTACTACATGCTCTTACA	ATGTTGTTAGATCTCACACTACTGGGCTACTAGACGCAATAAGCATGCTGCA	CCAAGACCTACATTGCCTCCATACATGACTCCGATTGAACCTCAGGTCGGG

amo		uncultured crenarchaeote	EU885633	TTGAGTAATAGTACATTGCTGACTATTAATGCAGGGGATTACATATTCT	CACCTGGGTGGCCAAAGGTGCATGGTTTGCATTAGGATACCGTATGACTT	GCTTGAGATGGCGTTCAAGTATCCAAGACCGACATTGCCTCCATACATGAC
amo	CAT1-7			TTACCTTACATTACAGGAGTCCCTGGTACCGCAACATATTATGCACTGAT	TGGATTCCATCGGCAATGTTATTGGATTGGCATATTGGGCAACAAGAAG	TCCAAGACCAACGTTACCACCATACATGACCCGATAGAACCGCAGGTAGG
amo		uncultured crenarchaeote	DQ148667	CTACACAGATTGGGCTTGGACATCCTTTGTAGTATTTCCATCTCACAAAC	ATGACAGTGTATACGTGGGTAGCAAAAGGTGCATGGTTTGCACTCGGATAT	CACTAGAGACTGCATTCAAGTATCCAAGACCAACGTTACCACCATACATGA
amo	SVA1-23			GGTGCAACATATTACCTAACATTTACAGGAGTCCAGGAACAGCAACATAC	ATGGATACCATCAGCAATGCTGTTGGACTTGGCATATTGGGCAACAAGAG	AAATATCCAAGACCTACGTTGCCACCATACATGACACCTATAGAACCAG
amo		uncultured crenarchaeote	EU885601	TAGTAGTCGTAGCAGTCAATTCAACTCTACTTGTAAATTAACGCAGGTGACT	TGTATACATGGGTAGCCAAAGGTGCATGGTTTTCACTTGGATATCCATACG	CAGTAGCAGATCCACTGGAGACTGCATTCAAGTATCCAAGACCTACGTTGC
amo	IBE2-7			TACTTTGATGCTTTGTGTCGGTGCAACATATTACCTAACATTTACAGGAGT	AGTTCCGGTATGGATACCATCAGCAATGCTGTTGGACTTGGCATATTGGGC	AGTAGCAGATCCACTGGAGACTGCATTCAAGTATCCAAGACCTACGTTGCC
amo		uncultured crenarchaeote	EU885616	GGACATCCTTTGTAGTATTTCCATCGCAAATACCTTTGATGCTTTGTGTAG	CCGGTATGGATACCATCAGCAATGCTGTTGGACTTGGCATATTGGGCAACA	ACCTATAGAACCGCAGGTGCGAAAGTCTATAACAGCCGATTTGCGCTTGG
amo	SVA1-18			ACACAGATTGGGCTTGGACCTCCTTTGTAGTATTTCCATCGCAAATACTT	CCAGTATGGATACCATCAGCAATGCTGTTGGACTTGGCATATTGGGCAACA	TGATCAGTAGCAGATCCACTGGAGACTGCATTCAAGTATCCAAGACCTA
amo		uncultured crenarchaeote	EU885547	TACACAGATTGGGCTTGGACATCCTTTGTAGTATTTCCATCGCAAATACT	GCCAAAGGTGCATGGTTTCACTAGGATATCCATACGACTTCATTGTAGTA	GAACCGCAGGTAGGAAAGTCTATAACAGCCGATTTGCGCTTGGCGCAGGA
amo	CAT1-16			CCTTTGTAGTATTCTCTATATCACAAACATTGATGTTAACGGTTGGAGCAT	ATGGTTTGCACTAGGATATCCATATGACTTTATTGTACACCCGTTTGGAT	AGTAATGGTCGGAATGTCGTTACCGTTATTCAATATGGTTAACTTGATTAC
amo		uncultured crenarchaeote	EU099954	CTTCTACACTGATTGGGCTTGGACATCCTTTGTAGTATTCTCCATCTCACA	GGTAGCCAAAGGTGCATGGTTTGCCTCGGATATCCATATGACTTCATTGT	GACTGCATTCAAGTATCCAAGACCCAGTTACCACCATATATGACACCGAT
amo	IBE2-16; IBE3-16			TTGGACATCCTTTGTAGTATTTCCATCGCAAATACTTTGATGCTTTGTGT	CATTGTAGTACCAGTATGGATACCATCAGCAATGCTGTTGGACTTGGCATA	TACAGTAGCAGATCCACTGGAGACTGCATTCAAGTATCCAAGACCTACGTT
amo		uncultured crenarchaeote	EU885614	ATAGTAGTCGTAGCAGTCAATTCAACTCTACTTGTAAATTAACGCAGGTGAC	GTGTATACATGGGTAGCCAAAGGTGCATGGTTTTCACTTGGATATCCATAC	ACAGTAGCAGATCCACTGGAGACTGCATTCAAGTATCCAAGACCTACGTTG
amo	SVA1-22			CAACATATTACCTAACATTTACAGGAGTTCAGGTACAGCAACATATTACG	AAGAGAATAAGCACTCTCTGATACTGTTTGGCGGAGTATTGTGTGAATG	CCATACATGACACCTATAGAACCGCAGGTAGGAAAGTTCCTAACAGCCCA
amo		uncultured crenarchaeote	EU885615	TAGACGATGTACTATTACTTATTATCATAGTAGGTAGCAGTCAATTCAAC	ATTATGACAGTGTATACATGGGTAGCCAAAGGTGCATGGTTTTCACTTGGGA	ACAGTAGCAGATCCACTGGAGACTGCATTCAAGTATCCAAGACCTACGTTG
amo	IBE2-14; IBE2-8			AGATTGGGCTTGGACCTCCTTTGTAGTATTTCCATCGCAAATACTTTGAT	GTATACATGGGTAGCCAAAGGTGCATGGTTTTCACTTGGATATCCATACGA	CTCTGTACTGTTTGGCGGAGTATTGTGTGAATGTCATTACCGTTGTT
amo	SVA2-2			ACITTGATGCTTTGTGTAGGTGCAACATATTACCTAACATTTACAGGAGTT	ATATGACTTTATTGTTACACAGTGTGGATTCTTCAGCGATGCTGTTGGA	TAAACCTGATTACAGTAGCAGATCCATTGGAGACTGCATTCAAGTATCCAA
amo		uncultured ammonia-oxidizing archaeon	AB373391; AB373386; AB373385; AB373377	ACTCACTACTTATTCATAGTAGTAGTCGAGTCAATTCAACTCTGCTTACA	ACAGTGATACATGGATAGCAAAAGGTGCATGGTTTGCCTTGGATATCCA	ACAGTAGCGGATCCATTGGAGACTGCATTCAAGTATCCAAGACCTACGTTG
amo	MAL2-15; MAL3-22			TATATCTTCTACACAGATTGGGCTTGGACATCCTTTGTAGTATTTCCATC		AGATCCATTGGAGACTGCATTCAAGTATCCAAGACCTACGTTGCCTCCATA
amo		uncultured archaeon	AB305359	ATTAATGCAGGTGACTATATCTTCTACACAGATTGGGCTTGGACATCCTTT	ATCATGACAGTGTATACGTGGATAGCAAAAGGTGCATGGTTTTCACTCGGA	ACCGTAGCAGATCCATTGGAGACTGCATTCAAGTATCCAAGACCTACGTTG
amo	CAT1-21			TGTAGTATTTTCCATATCACAAACATTGATGCTTACAGTAGGTGCAGTGTA	TAGGATATCCATATGACTTTATCGTTACACAGTATGGTTGCCATCAGCAA	AAATATCCGCGACCAACATTGCCACCATATATGACACCAATAGAACCAG



amo		uncultured crenarchaeote	EU885587	TACTTGTTCAATTATAGTAGTTGCGGTAACGGAACCTGCTTACAATTAAT	TTACTGTGTATACATGGGTTGCAAAAGGTGCATGGTTTTCACTTGATATC	CACCCATAGAACCAGGTTGAAAAATCTATAATAGCCCGTTGCGCTGG
amo	CAT3-15; CAT3-16			TACAATTAATGCAGGTGATTATTTTCTACACGGACTGGGCTTGGACTT	CTATGCATTAATCATTACTGTGTATACATGGRTTCAAAAGGTGCATGGTT	GTAAACAGTTGCAGACCCACTAGAAACGGCATTCAAATATCCGCGACCAAC
amo	IBE2-24			GACATCATTTGTAGTATTTTCCATATCACAAACATTGATGCTTACGGTAGG	TTGCAAAAGGTGCATGGTTTGCCTAGGATATCCATATGACTTTATCGTTA	ATTCAAATATCCAGCACCAACATTGCCGCCATATATGACCCCATAGAACC
amo	IBE2-15			TATCACAAACATTGATGCTTACGGTAGGAGCAGTGATTATCTGACATTTA	TATCGTTACACAGTATGGTTGCCATCAGCAATGTTGCTTGATCTGGCATA	ACCCATAGAACCAGGTTGAAAAATCTATAATAGCCCGTTGCGCTGGG
amo	IBE3-2; IBE3-1			TAATGCTGGTGACTATATTTTCTACACGGATTGGGCTTGGACTTCGTTTGT	CATTAATCATTACTGTGTATACATGGGTTGCAAAAGGTGCATGGTTTTAC	TGTTATTAGTTGCAGACCCACTAGAAACGGCATTCAAATACCCAGACCAA
amo	MAL2-13; MAL3-3			TAATGCAGGAGACTATATTTTCTACACAGACTGGGCATGGACATCATTTG	TCTCATAATGACTGTCTATACRTGGATAGCAAAAGGTGCATGGTTTTCACTTG GATATCCA	CCTATAGAACCAGGTAGGAAAGTTCTATAACAGTCCAGTGGCGTTAGGT
amo		uncultured crenarchaeote	EU885617	TGTACTCACTACTTATTCAATTGTAGTAGTAGCAGTAACTTACCCTGTTG	TTGATAATGACGGTGATACCTGGGTGTCTAAAGGTGCATGGTTTTCGCTA	CGCCGATAGAACCAGGTAGGAAAGTTCTATAACAGTCCGGTGGCGTTGG
amo	GRUPPO 1 AMO			ATCAATTAACGAGGTGACTACATTTTCTATACTGACTGGGCTTGGACAT	CTCTTATAATGACAGTATACACATGGATAGCAAAAGGTGCATGGTTTGAC	TGATAACCGTGGCAGACCCACTAGAAACGGCCTTCAAATATCCGAGACCGA
amo		uncultured crenarchaeote	DQ148677	TTATTCATAGTAGTAGTTGCAGTTAACTCAACACTGTAAACAATTAACGCA	ATGACAGTATACACATGGATAGCAAAAGGTGCATGGTTTGCACTTGGATAT	GTGGCAGACCCACTAGAAACGGCCTTCAAATATCCAAGACCAACATTACCA
amo	IBE3-11			AACAATTAACGAGGTGACTATATTTTCTATACTGACTGGGCTTGGACAT	GCCTTATTATGACAGTATACACATGGGTAGCTAAAGGTGCATGGTTTTAC	ACCGATAGAGCCGAGGTAGGAAAGTTCTATAACAGTCTGTAGCACTAGG
amo		uncultured ammonia-oxidizing archaeon	AB449305	ACTCAACACTGTAAACAATTAATGCAGGAGATTACATTTTCTATACTGACT	TTGACTTAGCATATTTGGGCTACAAAGAAGAACAACACTCGTTGATACTGT	GTTCTATAACAGTCCTGTGCGTTAGGTGCAGGTGCAGGTGCAGTATTGGG
amo	IBE3-24			TGACTATATTTTCTATACTGACTGGGCTTGGACATCGTTTGGGTATTTTC	CTTCATTGTACACCAAGTATGGCTTCCATCAGCAATGTTGCTTGATTGGC	GATAGAGCCGAGGTAGGAAAGTTCTATAACAGTCTGTAGCACTAGGTGC
amo	MAL1-15			AAACGTTGATGCTTGATAGGTGCAGCATATTACCTAACATTTACAGGT	GTCACACCAATATGGTTACCATCAGCAATGCTGTTGGACTTGGCATATTGG	AACAGTGGCAGACCCACTAGAAACGGCCTTCAAATATCCAAGACCAACATT
amo		uncultured crenarchaeote	EU650911	GGGCTTGGACATCGTTTACGGTATTCTCTATATCTCAAACGTTGATGCTTG	ACCATCAGCAATGCTGTTGGACTTGGCATATTGGCCACAAAGAAGAACAA	GTTCTATAACAGTCCTGTTGCACTTGGTGCAGGTGCAGGCGCAGTATTAGC
amo	SVA2-3; SVA2-13; SVA2-14			ACTTCGTTACGGTATTCTCAATATCTCAAACGTTGATGCTTGATAGGT	ACATGGATAGCAAAAGGTGCATGGTTTGCACTTGGATATCCATATGACTTC	GCCTTCAAATATCCGAGACCAACATTACCACCATACATGACGCCATAGAA
amo		uncultured crenarchaeote	EU885558	TTATTCATAGTAGTAGTTGCAGTTAACTCAACACTGTAAACAATTAATGCA	GTCACACCAATGTTTACCATCAGCAATGTTGCTTGATTGGCATATTGG	CGCCGATAGAACCAGGTAGGAAAGTTCTATAACAGTCCTGTTGCTTTAG
	SVA2-3; SVA2-10; SVA2-9	uncultured archaeon	AB305360	TTAACAATTAATGCAGGAGACTACATTTTCTATACTGACTGGGCTTGGACA	TCATTGTACACCAATATGGTTACCATCAGCAATGTTGCTTGATTGGCAT	ATAGAACCAGGAGGAAAGTTCTATAACAGTCCTGTTGCTTTAGGTGCT
amo				AACAATTAATGCAGGAGACTACATTTTCTATACTGATTGGGCTTGGACAT	TTACGCCCTTATCATGACGATTATACATGGATAGCAAAAGGTGCATGGTT	GATAACAGTGGCAGACCCACTAGAAACGGCCTTCAAATATCCAAGACCAAC
amo	SVA1-20; SVA1-8; SVA2-15; SVA2-5; SVA2-8			CTGATTGGGCTTGGACATCGTTTACGGTATTTTCAATATCTCAAACGTTGA	TAGCAAAAGGTGCATGGTTTTCTTAGGATATCCATATGACTTCATTGTCA	CGGCCTTCAAATATCCAAGACCAACATTGCCACCATACATGACGCCAATAG



amo	GRUPPO X (			AACATCAATTCTGGAGACTATATCTCTATACAGACTGGGCATGGACTT	TTATGGTTAATTATGCAAGTCTATACTTGGTTGCCAAAGTGGCATGGTA	GCTGATCGCGATCCGCTAGAAACTGCATTCAAGTACCAAGACCAACATT
amo		uncultured crenarchaeote	AM901417	ATCAATTCTGGAGACTATATCTCTATACAGACTGGGCATGGACTTCCTT	TGCAAGTCTATACTTGGTTGCCAAAGTGGCATGGTATGCATTGGCTATC	CGCCTATAGAACCGCAGGTCGGTAAGTTCTACAATAGCCCGGTAGCACTGG
amo				GGACATCCTTACCATTATCTCAATTTACAAATTTTATGCTTTGTGTAG	CAAAAGGAGCGTGGTTTGTCTTGGTTATCCATATGACTTTATTGTACAC	TGTATTCCCGTTGTTCAACATGATTAACCTATTGACAGTAGCTGACCCAC
amo		uncultured crenarchaeote	EU651274	TTTTCTACTGACTGGGCTGGACATCGTTACGGTATTTTCAATATCGC	TTTGCTCTTGGTTATCCATATGACTTCATTGTAACCAATTTGGTTGCCA	GGTAAATCTATAACAGTCCAGTAGCACTGGGTGCAGGTGCTGGTGAGTA
amo	MAL1-6			TGGACATCCTTTGTAGTATTTTCAATATCTCAACATTGATGCTTGGGGTA	CATGGTTTGCACTAGGATATCCATATGACTTTATTGTTACACCAGTGTGGT	CCAAGACCAACATTACCACCATACATGACCCCAATCGAACCGCAGGTCCGA
amo	MAL3-13			GATTGGGCTTGGACATCATTGTAGTATTTTCTATATCTCAACATTGATG	GGTTGCAAAAGGTGCATGGTTTGCACTAGGATATCCATATGACTTTATTGT	GCATTCAAATATCCGAGACCAACATTACCACCATATATGACCCCAATAGGA
amo	IBE2-4			GGCCTGGACATCCTTTGTAGTATCTCTATATCACAACGTTGATGCTCGT	AATATGGTTACCATCAGCAATGCTGTTGGACTTGGCGTACTGGGCAACAA	TATTGAACCGCAGGTGCGTAAGTTCTATAACAGTCCGGTCGCTTGGCGC
amo	CAT1-12			AATATCACAACATTGATGCTCGCAGTTGGTGCACATATTACCTTACATT	CGGATATCCATATGACTTTATTGTTACTCCAGTATGGTTACCATCAGCAAT	TGTTTAACTGGTAAACCTGATTACAGTTGCAGACCCACTAGAAACGGCAT
amo		uncultured crenarchaeote	EU049827	TTACTTGTTTAGTAGTGGTTGCAGTAACTCAACCTGTTAACAATTA	TTAATTATGACAGTATACACATGGGTAGCAAAAGGTGCATGGTTTGCACTC	ATTGAACCGCAGGTAGGAAAGTTCTATAACAGTCTGTTGCCCTGGGTGCT
amo	CAT1-15			TCAATATCACAACATTGATGCTCGCAGTTGGTGCACATATTACCTTAC	CCATATGACTTCATTGTTACTCCAATATGGTTACCATCAGCTATGTTGTG	TACAGTTGCGGACCCACTAGAAACGGCATTCAAATATCCAAGACCAACATT
amo		uncultured crenarchaeote	EU651115	ATTCATAGTAGTGTGCAGTTAACTCAACACTGTTAACAATTAACGCAGG	CACATGGGTAGCAAAAGGTGCATGGTTTGCACTAGGATATCCATATGACTT	TAACAGCCAGTTGCTCTCGGTGCAGGTGCAGGTGCAGTATTGGGATGTAC
amo	MAL3-21			GGAGATTACATCTTCTACACTGACTGGGCCTGGACTTCGTTTACGGTATTT	CGCCCTAATTATGACAGTATACACATGGATTGCAAAAGGTGCATGGTTTGC	AACGGTAGCAGACCCACTAGAAACGGCCTTCAAATATCCAAGACCGACGTT
amo		uncultured crenarchaeote	EU022806	ATAGTAGTTGTGGCAGTTAACTCTACATTGTTAACTATTAACGCAGGAGAT	TATTACCTTACATTTACAGGTGTTCCAGGAACGGCAACGTATTACGCCCTA	TTCAAATATCCGAGACCAACATTACCACCATACATGACACCTATAGAACCG
amo	MAL1-4			CAAACATTGATGCTTACAGTTGGAGCTTGTTATTATCTAACATTACAGGC	TTTGGCATATTGGGCAACAAAGAAGAACAAGCACTCGCTGATACTGTTTGG	
amo		uncultured crenarchaeote	EU885712	GTCTGGCTTAGACGATGTACTCACTATTTATTATTATAGTGGTTGCAGTC	TTTATCGTAACCCAGTGTGGATTCCACCGGCAATGTTGTTGGATTGGCA	GGAAAGTTCTATAACAGTCCGGTTCGCGCTTGGAGCAGGTGCTGGTGCTGTC

## CONCLUSIONI

Come già ampiamente esposto, gli ambienti marini giocano un ruolo di primaria importanza nella regolazione dei processi biologici.

Le correnti oceaniche non solo sono responsabili del ricircolo dei nutrienti, ma anche dei fattori climatici, che sono influenzati dalla concentrazione di CO<sub>2</sub> causa dell'effetto serra, che a sua volta è regolata dall'attività dei microrganismi marini.

Questo equilibrio precario viene spesso rotto dalle attività antropogeniche, ma è grazie alle immense e poco conosciute risorse marine che questo equilibrio viene prontamente ristabilito.

La consapevolezza del ruolo dei mari e degli oceani nel ricircolo della sostanza organica, dei nutrienti e degli elementi essenziali ha aumentato l'interesse degli studiosi verso questi ambienti.

In particolare le profondità oceaniche, anche a causa della difficoltà nelle operazioni di campionamento, risultano ancora praticamente inviolate.

Solo da qualche anno a questa parte è stato scoperto che persino nel buio più profondo microrganismi come i Crenarchaeota sono capaci di fissare la CO<sub>2</sub>, reazione che si pensava potesse avvenire solo ad opera degli organismi fotosintetici come prima tappa del Ciclo di Calvin.

Gli ambienti marini estremi, poi, a causa delle loro condizioni di vita praticamente proibitive hanno dato un ulteriore spinta di interesse nel momento in cui si è scoperto che non sono luoghi biologicamente morti, ma che al contrario giocano un ruolo importante nei principali cicli biogeochimici.

Proprio per questo motivo il mio studio è stato indirizzato in questa direzione.....verso gli abissi marini.

Considerando lo sviluppo che negli ultimi 10 anni ha avuto la tecnica microarray, soprattutto in campo ambientale, e approfittando della messa a punto del GeoChip (un chip espressamente progettato per il monitoraggio dei principali cicli biogeochimici e della degradazione dei contaminanti), ho voluto tentare l'applicazione della tecnica a campioni provenienti dai bacini anossici.

Nonostante questi campioni fossero difficili da trattare anche con le comuni tecniche biomolecolari, a causa dell'elevata concentrazione di sali, i risultati ottenuti

dalle analisi array hanno concordato con i dati ottenuti in passato e con le analisi filogenetiche e funzionali eseguite sul bacino Medea, fornendo uno spunto importante per la progettazione di un chip specifico per ambienti marini profondi ed estremi.

Le analisi sul gene 16S rRNA e sui geni *apr*, *mcr*, *cbbL* sono state condotte utilizzando cDNA, ciò dimostra la presenza di una popolazione microbica metabolicamente attiva.

I campioni di brina hanno mostrato un'attività legata a pathways metabolici legati all'organizzazione della CO<sub>2</sub> (*cbbL*), alla metanogenesi (*mcr*) e alla solfato riduzione (*apr*).

Per quanto riguarda i campioni di Interfaccia è stata evidenziata un'attività metabolicamente attiva relativa alla solfato riduzione (*apr*) ed all'organizzazione della CO<sub>2</sub> (*cbbL*), mancava l'attività legata ai metanogeni.

Il campioni di acqua profonda invece non hanno evidenziato la presenza di popolazioni attive.

Si può quindi affermare che elementi come il carbonio e lo zolfo vengono trasferiti da un compartimento biologico all'altro dalle comunità microbiche presenti all'interno dei bacini, dove si evidenzia un'attiva fissazione del carbonio da parte, molto probabilmente, di popolazioni appartenenti al gruppo degli Archaea.

La zona di Interfaccia invece mostra un'elevata attività nel ciclo dello zolfo, dimostrata dalla presenza di gruppi di solfo batteri.

I risultati prodotti dallo screening dei geni target del ciclo del carbonio e dello zolfo, eseguito sul bacino Medea hanno, perciò, evidenziato e confermato il fatto che nonostante le condizioni di vita proibitive i DHABs sono sede di importanti attività biologiche.

Questo lavoro non vuole essere un punto di arrivo ma piuttosto un punto di partenza verso la costruzione del DHABs chip. La raccolta di geni è ancora in corso. Considerando che altri due bacini nuovi sono stati recentemente scoperti, Kryos e Thetis, le informazioni su questi ambienti estremi non potranno che aumentare.

## **RINGRAZIAMENTI**

Desidero ringraziare prima di tutto la Dott.ssa Laura Giuliano ed il Dott. Michail Yakimov che mi hanno dato l'opportunità di trascorrere un periodo di studio negli Stati Uniti. Qui ho potuto lavorare ed entrare in contatto con una realtà totalmente diversa dalla nostra, una realtà dove i laboratori sono a di poco spaziali e dove si possono utilizzare reagenti costosi senza preoccuparsi di centellinare il microlitro, ma anche una realtà dove....e lo dico con orgoglio....i ricercatori NON sono più bravi di noi, ma solo ben finanziati.

Ringrazio ancora Micha, il mio Co-Tutor, che in questi tre anni mi ha seguita e guidata nel mio lavoro.

Grazie al Prof. Salvatore Fasulo che ha gentilmente accettato di referare la mia tesi....nonostante il breve preavviso ed i tempi stretti.

Un grazie particolare va alla Dott.ssa Lucia Toro che con grande disponibilità si è sempre prestata a risolvere i problemi di una dottoranda fuori sede!!!

Grazie soprattutto ai colleghi di lavoro.... in ordine alfabetico!!!! ☺ Francesca Crisafi, Mariella Genovese, Renata Denaro, Simone Cappello e Violetta La Cono, che mi hanno dato un supporto morale e materiale. Ma che soprattutto CI SONO STATI! In particolare Renata che mi ha seguita nella stesura della tesi.

In ultimo ma non meno importante, un grazie va alla mia famiglia sempre presente e senza la quale non sarei arrivata a questo punto.

## Bibliografia

**Affourtit, J., J. P. Zehr, and H. W. Paerl. 2001.** Distribution of nitrogen-fixing microorganisms along the Neuse River Estuary, North Carolina. *Microb. Ecol.* **41**:114–123

**Alexander Loy, Angelika Lehner, Natuschka Lee, Justyna Adamczyk, Harald Meier, Jens Ernst, Karl-Heinz Schleifer, and Michael Wagner. 2002.** Oligonucleotide Microarray for 16S rRNA Gene-Based Detection of All Recognized Lineages of Sulfate-Reducing Prokaryotes in the Environment. *Applied and Environmental Microbiology*, P. 5064–5081

**Alexander Loy, Kirsten Kusel, Angelika Lehner, Harold L. Drake, and Michael Wagner. 2004.** Microarray and Functional Gene Analyses of Sulfate-Reducing Prokaryotes in Low-Sulfate, Acidic Fens Reveal Cooccurrence of Recognized Genera and Novel Lineages. *Applied and Environmental Microbiology*, Dec. 2004, p. 6998–7009

**Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, et al. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389–3402.

**Amend, J. P., and E. L. Shock. 2001.** Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**: 175–243.

**Ana-Belen Martin Cuadrado, Purificacion Lopez-Garcia, Juan-Carlos Alba, David Moreira, Luis Monticelli, Axel Strittmatter, Gerhard Gottschalk, Francisco Rodriguez-Valera. (2007)** Metagenomics of the Deep Mediterranean, a Warm Bathypelagic Habitat. *PLoS ONE* **2**(9)

**Arrigo K. (2005).** Marine micro-organisms and global nutrient cycles. *Nature* **437**: 349-355

**Ashita Dhillon, Andreas Teske, Jesse Dillon, David A. Stahl, and Mitchell L. Sogin. 2003.** Molecular Characterization of Sulfate-Reducing Bacteria in the Guaymas Basin. *Applied and Environmental Microbiology*, May 2003, p. 2765–2772

**Beller, H. R., A. M. Spormann, P. K. Sharma, J. R. Cole, and M. Reinhard. 1996.** Isolation and characterization of a novel toluene-degrading sulfatereducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1188–1196.

**Birte Meyer and Jan Kuever. (2007).** Molecular Analysis of the Diversity of Sulfate-Reducing and Sulfur-Oxidizing Prokaryotes in the Environment, Using *aprA* as Functional Marker Gene. *Applied and Environmental Microbiology*. Dec. 2007, p. 7664–7679

**Bock, E. & Wagner, M. (2001).** Oxidation of inorganic nitrogen compounds as an energy source. In *The Prokaryotes: an Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, 3rd edn. Edited by M. Dworkin and others. New York: Springer Verlag.

**Boetius, A., K. Ravensschlag, C. J. Schuber, D. Rickert, F. Widdel, A. Gieseke, R. Amann, B. B. Jørgensen, U. Witte, and O. Pfannkuche. 2000.** A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* **407**: 623–626.

**Camerlenghi, A. (1990)** Anoxic basins of the Eastern Mediterranean: geological framework. *Mar Chem* **31**: 1–1

**Chamot-Rooke et al (coord) – DOTMED Deep Offshore Tectonics of the Mediterranean: a synthesis of deep marine data in the Eastern Mediterranean (Memoires Soc.Geol.de France 2005 n. 177)**

**Christopher A Francis, J Michael Beman and Marcel MM Kuypers. (2007).** New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *The ISME Journal* **1**, 19–27

**Codispoti, L. A. 1995.** Is the ocean losing nitrate? *Nature* **376**:724.

**Conrad, R. 1996.** Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H<sub>2</sub>, CO, CH<sub>4</sub>, OCS, N<sub>2</sub>O, and NO). *Microbiol. Rev.* **60**:609–640.

**de Lange, G. J., J. J. Middelburg, C. H. van der Weijden, G. Catalano, G. W. Luther III, D. J. Hyds, J. R. W. Woittiez, and G. P. Klinkhammer. 1990.** Composition of anoxic hypersaline brines in the Tyro and Bannock basins, eastern Mediterranean. *Mar. Chem.* **31**:63–88.

**DeLong EF. (2006).** Archaeal mysteries of the deep revealed. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 6417–6418.

**Devol, A. H. 1991.** Direct measurements of nitrogen gas fluxes from continental sediments. *Nature* **349**:319–321.

**Elizabeth A. Karr, W. Matthew Sattley, Melissa R. Rice, Deborah O. Jung, Michael T. Madigan, and Laurie A. Achenbach. 2005.** Diversity and Distribution of Sulfate-Reducing Bacteria in Permanently Frozen Lake Fryxell, McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Applied and Environmental Microbiology*, Oct. 2005, P. 6353–6359

**Elsaied HE, Kimura H, Naganuma T. (2007).** Composition of archaeal, bacterial, and eukaryal RuBisCO genotypes in three Western Pacific arc hydrothermal vent systems. *Extremophiles* **11**: 191–202.



**Francis CA, Roberts KJ, Beman JM, Santoro AE, Oakley BB. (2005).** Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 14683–14688.

**Galloway, J. N., and E. B. Cowling. 2002.** Reactive nitrogen and the world: two hundred years of change. *Ambio* 31: 64–71.

**Galushko, A., D. Minz, B. Schink, and F. Widdel. 1999.** Anaerobic degradation of naphthalene by a pure culture of a novel type marine sulfatereducing bacterium. *Environ. Microbiol.* 1:415–420

**Gesche Braker, Jizhong Zhou, Liyou Wu, Allan H. Devol, And James M. Tiedje. 2000.** Nitrite Reductase Genes (*nirK* and *nirS*) as Functional Markers To Investigate Diversity of Denitrifying Bacteria in Pacific Northwest Marine Sediment Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 2096–2104

**Graeme W. Nicol and Christa Schleper (2006)** Ammonia-oxidising Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle? *TRENDS in Microbiology* Vol.14 No.5 May 2006

**Grieg F. Steward, Bethany D. Jenkins, Bess B. Ward, and Jonathan P. Zehr. 2003.** Development and Testing of a DNA Macroarray To Assess Nitrogenase (*nifH*) Gene Diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, Mar. 2004, P. 1455–1465

**Guschin, D. Y., B. K. Mobarry, D. Proudnikov, D. A. Stahl, B. E. Rittman, and A. D. Mitzabekov. 1997.** Oligonucleotide microarrays as genosensors for determinative environmental studies in microbiology. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2397–2402.

**Hallam SJ, Konstantinidis KT, Putnam N, Schleper C, Watanabe Y, Sugahara J et al. (2006a).** Genomic analysis of the uncultivated marine crenarchaeote *Cenarchaeum symbiosum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 18296–18301.

**Hallam SJ, Mincer TJ, Schleper C, Preston CM, Roberts K, Richardson PM et al. (2006b).** Pathways of carbon assimilation and ammonia oxidation suggested by environmental genomic analyses of marine Crenarchaeota. *PLoS Biol* 4: e95.

**Hallsworth JE, Yakimov MM, Golyshin PN, Gillion JL, D’Auria G, de Lima AF et al. (2007).** Limits of life in MgCl<sub>2</sub>-containing environments: chaotricity defines the window. *Environ Microbiol* 9: 801–813.

**Henneke, E., and G. J. de Lange. 1990.** The distribution of DOC and POC in the water column and brines of the Tyro and Bannock basins. *Mar. Chem.* 31:113–122.

**HERMES-Hotspot Ecosystem Research on the Margins of European Seas. Issue 8**  
Spring 2007

**Herndl GJ, Reinthaler T, Teira E, van Aken H, Veth C, Pernthaler A et al. (2005).** Contribution of Archaea to total prokaryotic production in the deep Atlantic Ocean. *Appl Environ Microbiol* 71: 2303–2309.

**Holmes, A.J. et al. (1995).** Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. *FEMS Microbiol. Lett.* 132, 203–208

**Horowitz NE, Cameron RE & Hubbard JS (1972)** Microbiology of the dry valleys of Antarctica. *Science* 176: 242–245.

**Houghton, J. T., Y. Ding, D. J. Griggs, M. Noguer, P. J. van der Linden, and D. Xiaosu. 2002.** Climate Change 2001: The Scientific Basis: Contribution of Working Group I to the Third Assessment

<http://oceanworld.tamu.edu/resources/oceanography-book/carboncycle.htm>

**Ingalls AE, Shah SR, Hansman RL, Aluwihare LI, Santos GM, Druffel ER et al. (2006).** Quantifying archaeal community autotrophy in the mesopelagic ocean using natural radiocarbon. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 6442–6447.

**Jakobsen, R., and D. Postma. 1999.** Redox zoning, rates of sulphate reduction and interactions with Fe-reduction and methanogenesis in a shallow sandy aquifer, Romo, Denmark. *Geochim. Cosmochim. Acta* **63**: 137–151.

**Jizhong Zhou** - Development of Integrated Genomic Technology for Microbial Community Analysis

**Jizhong Zhou, Dorithea K. Thompson, Ying Xu. 2004.** Microbial functional genomics

**Jizhong Zhou, Sanghoon Kang, Christopher W. Schadt, and Charles T. Garten, Jr. 2008.** Spatial scaling of functional gene diversity across various microbial taxa. *PNAS* vol. 105 no. 22

**Jizhong Zhou. 2003.** Microarrays for bacterial detection and microbial community analysis. *Microbiology*. 6:288-294

**Jonathan P. Zehr, Bethany D. Jenkins, Steven M. Short and Grieg F. Steward. 2003.** Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environmental Microbiology* **5** (7), 539–554

**Jongsma, D., A. R. Fortuin, W. Huson, S. R. Troelstra, G. T. Klaver, J. M. Peters, D. van Harten, G. J. de Lange, and L. ten Haven. 1983.** Discovery of an anoxic basin within the Strabo trench, eastern Mediterranean. *Nature* **305**:795–797.

**Joseph J. Valino, 2003.** Modeling microbial consorzium as distributed metabolic networks. *Biol. Bull.* 204: 174-179

**Karen G. Lloyd, Laura Lapham, and Andreas Teske. (2006).** An Anaerobic Methane-Oxidizing Community of ANME-1b Archaea in Hypersaline Gulf of Mexico Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, Nov. 2006, p. 7218–7230

**Knoblauch, C., B. B. Jørgensen, and J. Harder. 1999.** Community size and specific sulfate reduction rates of psychrophilic sulfate-reducing bacteria in arctic sediments: evidence for high activity at low temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4230–4233.

**Konneke M, Bernhard AE, de la Torre JR, Walker CB, Waterbury JB, Stahl DA. (2005).** Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* **437**: 543–546.

**Langendijk, P. S., J. T. J. Hanssen, and J. S. van der Hoeven. 2000.** Sulfate-reducing bacteria in association with human periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* **27**:943–950.

**Lilburn, T. C., K. S. Kim, N. E. Ostrom, K. R. Byzek, J. R. Leadbetter, and J. A. Breznak. 2001.** Nitrogen fixation by symbiotic and free-living spirochetes. *Science* **292**:2495–2498

**Loy, A., A. Lehner, N. Lee, J. Adamczyk, H. Meier, J. Ernst, K. H. Schleifer, and M. Wagner. 2002.** Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:5064–5081.

**MacGregor, B. J., B. Van Mooy, B. J. Baker, M. Mellon, P. H. Moisaner, H. W. Paerl, J. Zehr, D. Hollander, and D. A. Stahl. 2001.** Microbiological, molecular biological and stable isotopic evidence for nitrogen fixation in the open waters of Lake Michigan. *Environ. Microbiol.* **3**:205–219.

**McTavish, H., J. A. Fuchs, and A. B. Hooper. 1993.** Sequence of the gene coding for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* **175**:2436–2444

MEDRIFF Consortium, *Eos* (Washington, DC) **76**, 313 (1995).

**Michail M Yakimov, Violetta La Cono, Renata Denaro, Giuseppe D’Auria, Franco Decembrini, Kenneth N Timmis, Peter N Golyshin and Laura Giuliano. (2007).** Primary producing prokaryotic communities of brine, interface and seawater above the halocline of deep anoxic lake L’Atalante, Eastern Mediterranean Sea. *The ISME Journal* (2007) **1**, 743–755

**Miziorko, H. H., and G. H. Lorimer. 1983.** Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase. *Annu. Rev. Biochem.* **52**:507–535.

**Myers E. W. 1999.** A fast bit-vector algorithm for approximate string matching based on dynamic programming. *J. ACM*, **46**, 539–553

**Nargang, F., L. McIntosh, and C. Somerville. 1984.** Nucleotide sequence of the ribulosebispophosphate carboxylase gene from *Rhodospirillum rubrum*. Mol. Gen. Genet. **193**:220–224.

**Nicol GW, Schleper C. (2006).** Ammonia-oxidising Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle? Trends Microbiol **14**: 207–212.

**Norman g. Hommes, luis a. Sayavedra-soto, and daniel j. Arp, 1998.** Mutagenesis and Expression of *amo*, Which Codes for Ammonia Monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. JOURNAL OF BACTERIOLOGY, p. 3353–3359 Online <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/>.

**Ohkuma, M., S. Noda, and T. Kudo. 1999.** Phylogenetic diversity of nitrogen fixation genes in the symbiotic microbial community in the gut of diverse termites. Appl. Environ. Microbiol. **65**:4926–4934.

**Ollivier, B., P. Caumette, J.-L. Garcia, and R. A. Mah. 1994.** Anaerobic bacteria from hypersaline environments. Microbiol. Rev. **58**:27–38.

**Paul W. J. J. van der Wielen, Henk Bolhuis, Sara Borin, Daniele Daffonchio, Cesare Corselli, Laura Giuliano, Giuseppe D’Auria, Gert J. de Lange, Andreas Huebner, Sotirios P. Varnavas, John Thomson, Christian Tamburini, Danielle Marty, Terry J. McGenity, Kenneth N. Timmis, BioDeep Scientific Party. 2005.** The Enigma of Prokaryotic Life in Deep Hypersaline Anoxic Basins. Science vol 307 7 January 2005

**Paul W. J. J. van der Wielen. (2006).** Diversity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase /oxygenase large-subunit genes in the MgCl<sub>2</sub>-dominated deep hypersaline anoxic basin discovery. FEMS Microbiol Lett **259** (2006) 326–331

**Phelps, C., L. J. Kerkhof, and L. Y. Young. 1998.** Molecular characterization of a sulfate reducing consortium that mineralizes benzene. FEMS Microbiol. Ecol. **27**:269–279.

**Rabus, R., R. Nordhaus, W. Ludwig, and F. Widdel. 1993.** Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. Appl. Environ. Microbiol. **59**:1444–1451.

**Rabus, R., T. Hansen, and F. Widdel. 2000.** Dissimilatory sulfate- and sulfurreducing prokaryotes. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt (ed.), The prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community, 3rd ed. Springer-Verlag, New York, N.Y.

**Ramsay, G. 1998.** DNA chips: state-of-the art. Nat. Biotechnol. **16**:40–44.

**Ravenschlag, K., K. Sahm, and R. Amann. 2001.** Quantitative molecular analysis of the microbial community in marine arctic sediments (Svalbard). *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:387–395.

**Ravenschlag, K., K. Sahm, C. Knoblauch, B. B. Jorgensen, and R. Amann. 2000.** Community structure, cellular rRNA content, and activity of sulfatereducing bacteria in marine arctic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:3592–3602. Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). Cambridge University Press, Cambridge, UK. Pp. 1–944.

**Rhee, S. K., X. D. Liu, L. Y. Wu, S. C. Chong, X. F. Wan, and J. Z. Zhou. 2004.** Detection of genes involved in biodegradation and biotransformation in microbial communities by using 50-mer oligonucleotide microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:4303–4317

**Rueter, P., R. Rabus, H. Wilkes, F. Aeckersberg, F. A. Rainey, H. W. Jannasch, and F. Widdel. 1994.** Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulfite reducing bacteria. *Nature* **372**:455–458.

**Sass AM, Sass H, Coolen MJ, Cypionka H, Overmann J. (2001).** Microbial communities in the chemocline of a hypersaline deep-sea basin (Urania basin, Mediterranean Sea). *Appl Environ Microbiol* **67**: 5392–5402

**Schena, M. et al., (Jul. 1998)** “Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics” *TIBTECH* **16**:301-306.

**Schlesinger, W. H. 1997.** *Biogeochemistry: An Analysis of Global Change*, 2nd ed. Academic Press, San Diego, CA.

**Schoenborn, L., H. Abdollahi, W. Tee, M. Dyll-Smith, and P. H. Janssen. 2001.** A member of the delta subgroup of *Proteobacteria* from a pyogenic liver abscess is a typical sulfate reducer of the genus *Desulfovibrio*. *J. Clin. Microbiol.* **39**:787–790.

**Schulz, H. N., T. Brinkhoff, T. G. H. M. M. Ferdelman, A. Teske, and B. B. Jørgensen. 1999.** Dense populations of a giant sulfur bacterium in Namibian shelf sediments. *Science* **284**: 493–495.

**Seitzinger, S. P. 1990.** Denitrification in aquatic sediments, p. 301–322. *In* N. P. Revsbech and J. Sørensen (ed.), Denitrification in soil and sediment. Plenum Press, New York, N.Y.

**Shalon, D., J., Smith, and P. O. Brown. 1996.** A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res.* **6**:639-645.

**Siegel BZ, McMurty G, Siegel SM, Chen J & LaRock P. (1979).** Life in the calcium chloride environment of Don Juan pond, Antarctica. *Nature* **280**: 828–829.

**So, C. M., and L. Y. Young. 1999.** Isolation and characterization of a sulfatereducing bacterium that anaerobically degrades alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:2969–2976.

**Steward GF, Jenkins BD, Ward BB, Zehr JP. (2004).** Development and testing of a DNA microarray to assess nitrogenase (nifH) gene diversity. *Appl Environ Microbiol* 70: 1455–1465.

**Steward, G. F., J. P. Zehr, R. Jellison, J. P. Montoya, and J. T. Hollibaugh.** Vertical distribution of nitrogen-fixing phylotypes in a meromictic, hypersaline lake. *Microb. Ecol.*, in press.

**Sung-Keun Rhee, Xueduan Liu, Liyou Wu, Song C. Chong, Xiufeng Wan, and Jizhong Zhou. 2004.** Detection of Genes Involved in Biodegradation and Biotransformation in Microbial Communities by Using 50-Mer Oligonucleotide Microarrays. *Applied and Environmental Microbiology*, July 2004, p. 4303–4317

**Tabita, F. R. 1988.** Molecular and cellular regulation of autotrophic carbon dioxide fixation in microorganisms. *Microbiol. Rev.* **52**:155–189.

**Taroncher-Oldedburg, G., E. M. Griner, C. A. Francis, and B. B. Ward. 2003.** Oligonucleotide microarray for the study of functional gene diversity in the nitrogen cycle in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1159–1171.

**Teresa E. Koper, Amal F. E-Sheikh, Jeanette M. Norton, and Martin G. Klotz. (2003)** Urease-Encoding Genes in Ammonia-Oxidizing Bacteria.

**Tiquia, S. M., L. Wu, S. C. Chong, S. Passovets, D. Xu, Y. Xu, and J. Zhou. 2004.** Evaluation of 50-mer oligonucleotide arrays for detecting microbial populations in environmental samples. *BioTechniques* **36**:664–675.

**Ulrike Purkhold, Michael Wagner, Gabriele Timmermann, Andreas Pommerening-Roser and Hans-Peter Koops. 2003.** 16S rRNA and amoA-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing isolates: extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitrosomonads. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2003), 53, 1485–1494

**Vallino, J. J., C. S. Hopkinson, and J. E. Hobbie. 1996.** Modeling bacterial utilization of dissolved organic matter: optimization replaces Monod growth kinetics. *Limnol. Oceanogr.* **41**: 1591–1609.

**Wagner, M., A. J. Roger, J. L. Flax, G. A. Brusseau, and D. A. Stahl. 1998.** Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration. *J. Bacteriol.* **180**:2975–2982.

**Wallmann, K., Suess, E., Westbrook, G.H., Winckler, G., Cita, M.B. (1997)** Salty brines on the Mediterranean sea floor. *Nature* **387**: 31–32.

**Waterbury JB, Stahl DA. (2005).** Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437: 543–546.

**Widdel, F., and F. Bak. 1992.** Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria, p. 3352–3378. *In* A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*, 2nd ed. Springer, New York, N.Y.

**Wood, P. M. 1986.** Nitrification as a bacterial energy source, p. 39–62. *In* J. I. Prosser (ed.), *Nitrification*. Society for General Microbiology, IRL Press, Oxford, England.

**Wu L, Liu X, Schadt CW, Zhou J. (2006a).** Microarraybased analysis of sub-nanogram quantities of microbial community DNAs using Whole Community Genome Amplification (WCGA). *Appl Environ Microbiol* 72: 4931–4941.

**Wu, L. Y., D. K. Thompson, G. Li, R. A. Hurt, J. M. Tiedje, and J. Zhou. 2001.** Development and evaluation of functional gene arrays for detection of selected genes in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5780–5790.

**Wuchter C, Abbas B, Coolen MJ, Herfort L, van Bleijswijk J, Timmers P et al. (2006).** Archaeal nitrification in the ocean. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 12317–12322.

**Xingyuan Li, Zhili He and Jizhong Zhou. (2005).** Selection of optimal oligonucleotides probes for microarrays using multiple criteria, global alignment and parameter estimation. *Nucleic Acid Research*, Vol. 33, No 19

**Xingyuan Li, Zhili He and Jizhong Zhou. 2005.** Selection of optimal oligonucleotides probes for microarrays using multiple criteria, global alignment and parameter estimation. *Nucleic acid research* vol. 33 No 19

**Zehr, J. P., M. T. Mellon, and S. Zani. 1998.** New nitrogen-fixing microorganisms detected in oligotrophic oceans by amplification of nitrogenase (*nifH*) genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3444–3450

**Zhang, X., and L. Y. Young. 1997.** Carboxylation as an initial reaction in the anaerobic metabolism of naphthalene and phenanthrene by sulfidogenic consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4759–4764.

**Zhili He and Jizhong Zhou. (2008).** Empirical Evaluation of a New Method for Calculating Signal-to-Noise Ratio for Microarray Data Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, May 2008, p. 2957–2966

**Zhili He, Terry J Gentry, Christopher W Schadt, Liyou Wu, Jost Liebich, Song C Chong, Zhijian Huang, Weimin Wu, Baohua Gu, Phil Jardine, Craig Criddle and Jizhong Zhou. (2007).** GeoChip: a comprehensive microarray for investigating biogeochemical, ecological and environmental processes. *The ISME Journal* (2007) 1, 67–77

**Zhou, J., M. A. Bruns, and J. M. Tiedje.** 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:461–468.